



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

**Εφαρμογές Μοριακής Βιολογίας - Μοριακή Γενετική - Διαγνωστικοί
Δείκτες**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Φαρμακογενετική μελέτη των γονιδίων *CYP3A4* και
CYP3A5 και ανταπόκρισης στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη
σε ασθενείς με ψωρίαση στον ελληνικό πληθυσμό**

Μενδρινού Ευφροσύνη

Μοριακή Βιολόγος-Γενετίστρια

Λάρισα 2015

**Φαρμακογενετική μελέτη των γονιδίων *CYP3A4* και *CYP3A5* και
ανταπόκρισης στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη σε ασθενείς με ψωρίαση
στον ελληνικό πληθυσμό**

**Pharmacogenetic study of *CYP3A4* and *CYP3A5* genes and response to
therapy with cyclosporine in patients with psoriasis in the Greek
population**

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Σαραφίδου Θεολογία

Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας (Επιβλέπουσα)

Μαμούρης Ζήσης

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών

Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ζαφειρίου Ευτέρπη

Επίκουρος Καθηγήτρια Δερματολογίας, Τομέας Παθολογίας, Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Στην Αριστεά...

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών: Εφαρμογές Μοριακής Βιολογίας - Μοριακή Γενετική - Διαγνωστικοί Δείκτες.

Κατά κύριο λόγο, οφείλω να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στην επιβλέπουσα Επίκουρο Καθηγήτρια του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Κα Σαραφίδου Θεολογία, η οποία με τίμησε με την εμπιστοσύνη που μου έδειξε για την εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης. Την ευχαριστώ επίσης για τις πολύτιμες γνώσεις και συμβουλές που μου παρείχε καθόλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου και της εργασίας μου.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στον κ. Βασιλόπουλο Ιωάννη, αφού χωρίς την αμέριστη και απλόχερη βοήθειά του, η ολοκλήρωση της μελέτης θα ήταν αδύνατη. Το αμείωτο ενδιαφέρον, οι υποδείξεις, η καθοδήγηση, η προθυμία του και η συμπαράστασή του οδήγησαν στην ομαλή διεκπεραίωση της εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Μαμούρη Ζήση και την κ. Ζαφειρίου Ευτέρπη για τη συμμετοχή τους στην Τριμελή Επιτροπή.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω το διδάκτορα Σταμάτη Κωνσταντίνο καθώς και όλα τα μέλη του εργαστηρίου.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω πολύ τους γονείς μου, στους οποίους οφείλω όλη τη διαδρομή των σπουδών μου, μέχρι σήμερα και τους φίλους μου για τη στήριξη, τη συμπαράσταση και την κατανόησή τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
ABSTRACT.....	2
1. Εισαγωγή	
1.1 Ψωρίαση: Γενικά και επιδημιολογία της ψωρίασης	3
1.2 Αιτιολογία της ψωρίασης	4
1.2.1 Γενετικοί παράγοντες.....	4
1.2.2 Περιβαλλοντικοί-εκλυτικοί παράγοντες	5
1.3 Ιστολογικά χαρακτηριστικά	7
1.4 Ανοσολογική απάντηση-ανοσοπαθογένεια της ψωρίασης	8
1.5 Κλινικές μορφές ψωρίασης	9
1.6 Διάγνωση-διαφορική διάγνωση ψωρίασης	12
1.7 Αξιολόγηση της βαρύτητας της νόσου	13
1.8 Συσχέτιση ψωρίασης με άλλα νοσήματα	14
1.9 Θεραπεία της ψωρίασης	15- 22
1.9.1 Τοπικές θεραπείες	15
1.9.2 Φωτοθεραπεία	16
1.9.3 Βιολογικοί παράγοντες	16
1.9.4 Συστηματική θεραπεία-Κυκλοσπορίνη	18
1.10 Φαρμακοκινητική των αναστολέων καλσινευρίνης	23
1.10.1 P-γλυκοπρωτεΐνη	23
1.10.2 Κυτόχρωμα P450	24
1.11 Φαρμακογενετική	24
1.11.1 Φαρμακογενετικές μελέτες σε ασθενείς με ψωρίαση	25
1.11.2 Πολυμορφισμοί σε ένζυμα μεταβολισμού φαρμάκων	26
• Γενετική ποικιλότητα του CYP3A	
• Γενετικοί πολυμορφισμοί στο CYP3A4	
▪ CYP3A4*1B (rs2740574)	
• Γενετικοί πολυμορφισμοί στο CYP3A5	
▪ CYP3A5*3 (rs776746)	

1.11.3 Φαρμακογενετική των αναστολέων καλσινευρίνης.....	30
1.12 Σκοπός	32
2. Πειραματικό μέρος	
2.1 Πληθυσμός μελέτης	33
2.2 Μεθοδολογία ταυτοποίησης γονοτύπου	33
2.2.1 Απομόνωση DNA από δείγμα περιφερικού αίματος	33
2.2.2 Έλεγχος της αποτελεσματικότητας της απομόνωσης του DNA.....	35
• Ηλεκτροφόρηση-Αρχή της μεθόδου	
• Κατασκευή πηκτώματος αгарόζης	
2.2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	37
Αρχή της μεθόδου	
• Ενίσχυση της επιθυμητής αλληλουχίας	
• PCR mix	
• Ανίχνευση προϊόντων PCR	
2.2.4 Ταυτοποίηση γενετικών πολυμορφισμών	40
• Γενετικός πολυμορφισμός CYP3A5*3	
• Γενετικός πολυμορφισμός CYP3A4*1B	
○ Πήκτωμα πολυακρυλαμίδης-ουρίας	
2.2.5 Αλληλούχηση (sequencing)	44
3. Αποτελέσματα	
3.1 Προφίλ ασθενών.....	45
3.2 Απομόνωση DNA από κύτταρα περιφερικού αίματος	46
3.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	46
3.4 Γονοτύπηση-Αλληλούχηση	47
3.5 Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων	51
4. Συζήτηση	52
Βιβλιογραφία	55

Περίληψη

Η ψωρίαση είναι μια χρόνια, συστηματική, φλεγμονώδης δερματοπάθεια, η οποία προσβάλλει το 1-3% του παγκόσμιου πληθυσμού. Η νόσος χαρακτηρίζεται κλινικά από ερυθρηματώδεις πλάκες διαφόρων μεγεθών, που καλύπτονται από αργυρόχροα λέπια. Η βλάβη συνδυάζει ανωμαλίες του κερατινοκυττάρου (αυξημένη μιτωτική δραστηριότητα και ανώμαλη διαφοροποίηση) με φλεγμονώδεις εκδηλώσεις του χορίου και της επιδερμίδας. Η ψωρίαση εξαρτάται από γενετικούς παράγοντες οι οποίοι πυροδοτούνται από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες.

Η κυκλοσπορίνη είναι ένα ανοσοκατασταλτικό φάρμακο που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της μέτριας ή σοβαρής ψωρίασης. Οι ασθενείς παρουσιάζουν ετερογένεια όσον αφορά την ανταπόκρισή τους στη θεραπεία, η οποία πιθανότατα οφείλεται σε γενετικούς παράγοντες. Διαφορές στη δραστηριότητα συγκεκριμένων ενζύμων τα οποία δρουν μεταβολίζοντας τα χορηγούμενα φάρμακα, όπως τα *CYP3A4* και *CYP3A5*, μπορεί να έχουν ως αποτέλεσμα μειωμένη φαρμακολογική αποτελεσματικότητα καθώς ακόμα και εκδήλωση ανεπιθύμητων παρενεργειών.

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να διευκρινιστεί αν οι πολυμορφισμοί rs2740574 και rs776746 των γονιδίων *CYP3A4* και *CYP3A5* αντίστοιχα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υποψήφιοι βιοδείκτες για την ανταπόκριση στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη, σε ασθενείς με ψωρίαση μετά από θεραπεία 3 μηνών.

Τον πληθυσμό μελέτης αποτέλεσαν 63 ασθενείς με διαπιστωμένη ψωρίαση που έλαβαν θεραπεία με κυκλοσπορίνη για 3 μήνες από το Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Λάρισας και το Νοσοκομείο Παπαγεωργίου Θεσσαλονίκης. Η γονοτύπηση αφορούσε στην ανεύρεση των αλληλομόρφων *CYP3A4**1B και *CYP3A5**3.

Στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε μόνο στον πολυμορφισμό rs776746 καθώς ο πολυμορφισμός rs2740574 φάνηκε να μην ακολουθεί την ισορροπία Hardy-Weinberg.

Η στατιστική ανάλυση του πολυμορφισμού rs776746, δεν έδειξε καμία στατιστικώς σημαντική συσχέτιση του αλληλομόρφου G με την απόκριση στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη ($P=0,62$) και συνεπώς δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως φαρμακογενετικός δείκτης ψωρίασης-κυκλοσπορίνης στον ελληνικό πληθυσμό.

Οι μελλοντικές μελέτες θα πρέπει πιθανώς να εστιαστούν σε άλλους πολυμορφισμούς που επηρεάζουν τη θεραπεία με κυκλοσπορίνη τόσο σε αυτά τα γονίδια όσο και σε άλλα γονίδια που αποτελούν άμεσους ή έμμεσους στόχους του φαρμάκου ή επηρεάζουν την φαρμακοκινητική. Επίσης, θα ήταν ενδιαφέρουσες και μελέτες δόσης-απόκρισης, καθώς στην κλινική πράξη η δόση κυμαίνεται μεταξύ 3-5mg.

Abstract

Psoriasis is a chronic, systemic, inflammatory skin disease, that affects 1-3% of the population worldwide. The disease is clinically characterized by erythematous patches of various sizes, covered by silvery scales. The lesion combines keratinocyte abnormalities (increased mitotic activity and abnormal differentiation) with inflammation of dermis and epidermis. Psoriasis is dependent on genetic factors triggered by various environmental factors.

Cyclosporine is an immunosuppressive drug which is used to treat moderate to severe psoriasis. Patients exhibit heterogeneity in their response to therapy which is probably due to genetic factors. Differences in the activity of specific enzymes which act metabolizing the administered drugs, such as CYP3A4 and CYP3A5, can result in decreased pharmacological efficiency and even toxicity.

The purpose of this study was to determine whether polymorphisms rs2740574 and rs776746 of *CYP3A4* and *CYP3A5* respectively can be used as candidate biomarkers for response to therapy with cyclosporine in patients with psoriasis after 3 months of therapy.

Our population consisted of 63 patients with confirmed psoriasis which were treated with cyclosporine for at least 3 months at the University Hospital of Larissa and Papageorgiou Hospital of Thessaloniki. The genotyping was referring to the discovery of CYP3A4*1B and CYP3A5*3 alleles.

Statistical analysis was performed only to the rs776746 polymorphism as polymorphism rs2740574 appeared not to follow Hardy-Weinberg equilibrium.

The statistical analysis of rs776746 showed no statistically significant association of G allele with the response to treatment with cyclosporine ($P=0.62$) and consequently this SNP is excluded as a pharmacogenetic marker for psoriasis-cyclosporine in the Greek population.

Future studies should probably focus on other polymorphisms which influence treatment with cyclosporine both in these genes and in other genes that are direct or indirect targets of drug or affect the pharmacokinetics. It would also be interesting and dose-response studies, as well as in clinical practice, the dose ranges between 3-5mg.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΨΩΡΙΑΣΗ: Γενικά και επιδημιολογία της ψωρίασης

Η ψωρίαση είναι μια χρόνια, πολυπαραγοντική, μη μεταδοτική, αυτοάνοση ασθένεια που εμφανίζεται στο δέρμα και τις αρθρώσεις. Η κλινική εικόνα της ψωρίασης είναι ερυθρηματώδεις κηλίδες (ψωριασικές πλάκες) που καλύπτονται από παχιά αργυρόχρωμα λέπια (Langley et al, 2005). Προσβάλλει το 1-3% του γενικού πληθυσμού παγκοσμίως (σε όλες τις περιοχές του πλανήτη και σε όλες τις πληθυσμιακές ομάδες) αλλά η συχνότητα ποικίλλει. Είναι συχνότερη στην καυκάσια φυλή, με το ποσοστό εμφάνισής της να υπολογίζεται σε 2-3% στη Βόρεια Αμερική και Ευρώπη, ενώ ανέρχεται στο 7% στη Βόρεια Ευρώπη. Σε άλλες πληθυσμιακές ομάδες μειώνεται το ποσοστό εμφάνισης, φτάνοντας στο 0% στους Εσκιμώους και στο 0.1% στους ιθαγενείς της Νοτίου Αμερικής. Στην Ελλάδα εμφανίζεται στο 3% του πληθυσμού (Καραμπίδου Κ και συν, 2010).

Η ψωρίαση προσβάλλει με την ίδια συχνότητα άντρες και γυναίκες και είναι δυνατό να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε ηλικία, παρουσιάζοντας όμως υψηλότερη συχνότητα σε δύο ηλικιακές ομάδες. Γι' αυτό το λόγο γίνεται η διάκριση της νόσου σε δύο τύπους. Άτομα με πρώιμη έναρξη της νόσου (16-22 έτη) (τύπος I) έχουν θετικό οικογενειακό ιστορικό και συνήθως έχουν πιο σοβαρή εκδήλωση της νόσου (επίσης ο τύπος I εμφανίζει μεγαλύτερη συσχέτιση με το αλληλόμορφο HLA-Cw6 του γονιδίου HLA-C). Άτομα με όψιμη έναρξη της νόσου (57-60 ετών) (τύπος II) έχουν σποραδική εμφάνιση της νόσου και ηπιότερη εκδήλωση (μικρότερη συσχέτιση με το HLA-Cw6) (Εικόνα 1) (Henseler T et al, 1985).

ΤΥΠΟΣ I	ΤΥΠΟΣ II
<ul style="list-style-type: none">□ Πρώιμη έναρξη□ 16 – 22 ετών□ Οικογενειακό ιστορικό□ 85% συσχέτιση με HLA Cw6□ Βαρύτερη νόσος	<ul style="list-style-type: none">□ Όψιμη έναρξη□ 57 – 60 ετών□ Σποραδική□ 15% συσχέτιση με HLA Cw6□ Ηπιότερη πορεία

Εικόνα 1: Δύο τύποι ψωρίασης ανάλογα με την ηλικία εμφάνισης, τη σποραδική ή οικογενή εμφάνιση της νόσου, τη συσχέτιση με το αλληλόμορφο HLA-Cw6 και τη βαρύτητα της νόσου.

1.2 ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑ

Η ψωρίαση είναι μια πολυπαραγοντική νόσος, με άγνωστη προς το παρόν αιτιολογία.

Η εμφάνιση της ψωρίασης οφείλεται στην επίδραση περιβαλλοντικών παραγόντων σε άτομα που είναι γενετικά προδιατεθειμένα και οδηγεί σε τροποποιημένη ανοσολογική απάντηση. Επομένως, οι περιβαλλοντικοί και οι γενετικοί παράγοντες καθώς και η ανοσολογική απόκριση συμμετέχουν στην παθογένεια της ψωρίασης.

1.2.1 ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Από μελέτες έχουν προκύψει στοιχεία που επιβεβαιώνουν τη γενετική προδιάθεση για την εκδήλωση της ψωρίασης.

Η γενετική βάση της ψωρίασης στηρίζεται σε μελέτες σε οικογένειες, επιδημιολογικές μελέτες βασισμένες στον πληθυσμό, μελέτες διδύμων, μελέτες συσχέτισης σε ανθρώπινα αντιγόνα λευκοκυττάρων (HLAs), μελέτες σάρωσης του γονιδιώματος (GWAS) και μελέτες υποψήφιων γονιδίων εντός ή εκτός του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) (Rahman, Elder, 2005).

Υπάρχει αυξημένος κίνδυνος εμφάνισης της νόσου όταν υπάρχει συγγενής με ψωρίαση. Συγκεκριμένα, ο κίνδυνος εμφάνισης της νόσου στους απογόνους είναι 50% όταν και οι δύο γονείς νοσούν, 16% όταν ο ένας γονέας έχει ψωρίαση και 8% όταν κανένας γονέας δεν νοσεί, αλλά υπάρχει παιδί που έχει αναπτύξει ψωρίαση. Οι άντρες έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο μεταβίβασης της ψωρίασης στους απογόνους απ' ό,τι οι γυναίκες, κάτι το οποίο πιθανότατα οφείλεται σε γονιδιωματική αποτύπωση.

Με βάση τις μελέτες σε διδύμους, η κληρονομικότητα της ψωρίασης έχει εκτιμηθεί στο 60-90%, ποσοστό από τα υψηλότερα των πολυπαραγοντικών νοσημάτων. Παρόμοια ποσοστά 64-73% έχουν αναφερθεί μεταξύ μονοζυγωτικών διδύμων ενώ η κληρονομικότητα σε διζυγωτικά δίδυμα εκτιμάται στο 12-30% (Juliana L Basko-Plluska, 2012). Όμως, το γεγονός ότι το ποσοστό συμπτωτικότητας της νόσου σε μονοζυγωτικούς διδύμους δεν είναι 100% δείχνει τη σημαντικότητα των περιβαλλοντικών και άλλων παραγόντων στην παθογένεια της νόσου.

Δεν υπάρχει συγκεκριμένο γονίδιο το οποίο να έχει αποδειχτεί ότι ευθύνεται για την εμφάνιση της ψωρίασης. Αντίθετα υπάρχει ένα σύνολο γενετικών χαρακτηριστικών τα οποία αυξάνουν τις πιθανότητες για τον ασθενή να αναπτύξει την ασθένεια.

Τουλάχιστον το 10% του γενικού πληθυσμού κληρονομεί ένα ή περισσότερα γονίδια που δημιουργούν προδιάθεση για την ψωρίαση.

Μόνο το 2-3% του πληθυσμού αναπτύσσει τη νόσο καθώς μόνο αυτό το ποσοστό φέρει το συγκεκριμένο συνδυασμό γενετικών χαρακτηριστικών. 30-50% των περιπτώσεων ψωρίασης έχουν οικογενειακό ιστορικό της νόσου.

Από μελέτες συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος (GWAS) ψωριασικών ασθενών έχουν χαρτογραφηθεί εννέα γενετικοί τόποι οι οποίοι φαίνεται να σχετίζονται με ευαισθησία στην ψωρίαση (Lowes et al, 2007). Τα γονίδια αυτά συμμετέχουν είτε στον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων είτε στην ανοσολογική απάντηση, την ωρίμανση των Τ λεμφοκυττάρων και την έκφραση μορίων του μείζονος συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC).

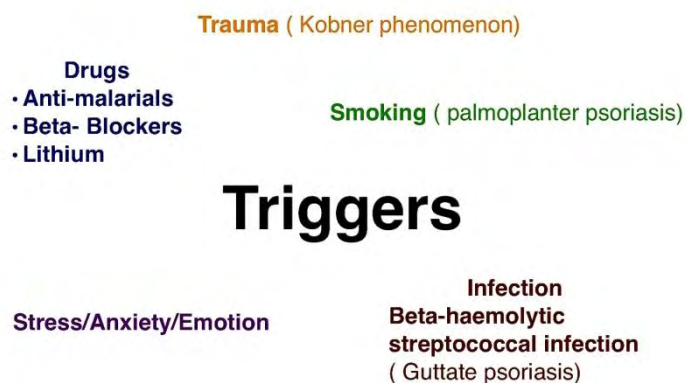
Οι γενετικοί τόποι που φαίνεται να σχετίζονται με την ψωρίαση ονομάστηκαν PSORS1-9.

Ο σημαντικότερος από αυτούς είναι ο PSORS1, ο οποίος είναι υπεύθυνος για το 35-40% των περιπτώσεων με θετικό οικογενειακό ιστορικό ψωρίασης. Εδράζεται στην περιοχή του Μείζονος Συμπλέγματος Ιστοσυμβατότητας (Major Histocompatibility Complex, MHC) στο χρωμόσωμα 6p, καταλαμβάνοντας μια περιοχή ~300kb στο τμήμα HLA-B του χρωμοσώματος. Τα σημαντικότερα γονίδια που περιλαμβάνει είναι το HLA-Cw6 που κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη MHC I, το HLA-B13, το HLA-Bw17, το HLA-DR7, το CCHCR1 και το CDSN που κωδικοποιεί την κορνεοδεσμοσίνη (συγκολλητική πρωτεΐνη της επιδερμίδας που βρίσκεται αυξημένη στην ψωρίαση) (Trembath et al, 1997).

Το αλληλόμορφο που εμφανίζει την ισχυρότερη συσχέτιση με την εμφάνιση της ψωρίασης είναι το HLA-Cw6, καθώς φαίνεται να σχετίζεται τόσο με την κλινική μορφή της νόσου, όσο και με την ηλικία έναρξης, την πορεία και την πρόγνωση της νόσου (Vinod Chandran, 2010).

1.2.2 ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΙ-ΕΚΛΥΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Εκτός από τους γενετικούς παράγοντες, υπάρχουν και οι εκλυτικοί παράγοντες (Εικόνα 2), οι οποίοι προέρχονται είτε από το περιβάλλον, με άμεση επίδραση στο δέρμα, είτε επιδρούν μέσω της κυκλοφορίας και παίζουν σημαντικό ρόλο στην ενεργοποίηση ή την επιδείνωση της ψωρίασης.



Εικόνα 2: Εκλυτικοί παράγοντες της ψωρίασης

- **Βλάβη του δέρματος- τραυματισμός**

Διάφορα είδη τραυματισμών όπως δάγκωμα από ζώο, τσίμπημα εντόμου, αμυχές, ουλές, ηλιακά εγκαύματα κ.ά, μπορούν να οδηγήσουν στην εμφάνιση ψωριασικών βλαβών στο 30% των ατόμων που ήδη νοσούν από ψωρίαση (Holzmann et al, 1992). Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται Koebner και εμφανίζεται συνήθως 10-14 ημέρες μετά τον τραυματισμό. Οι νέες βλάβες που δημιουργούνται είναι πανομοιότυπες με αυτές τις ίδιες της ασθένειας και γι' αυτό ονομάζεται και "ίσομορφική απάντηση". Το φαινόμενο αυτό επιδεινώνει την ψωρίαση. Έχει παρατηρηθεί και το αντίστροφο, δηλαδή η εξαφάνιση ψωριασικής βλάβης μετά από τραυματισμό (αντίστροφο φαινόμενο Koebner). Το φαινόμενο Koebner εμφανίζεται συχνότερα στην ομάδα των ψωριασικών ασθενών με πρώιμη έναρξη της νόσου (Holzmann et al, 1992)

- **Λοίμωξη**

Διάφορες μικροβιακές λοιμώξεις σχετίζονται με την ανάπτυξη ή/ και την επιδείνωση της ψωρίασης. Ισχυρή συσχέτιση φαίνεται να υπάρχει στην επαγωγή της σταγονοειδούς ψωρίασης-κυρίως σε παιδιά- από προηγούμενη στρεπτοκοκκική λοίμωξη του φάρυγγα, στο 90% των ασθενών με ψωρίαση (England et al, 1997).

Άλλοι μικροοργανισμοί οι οποίοι προκαλούν έξαρση της ψωρίασης είναι οι *Staphylococcus aureus*, *Malassezia*, *Candida albicans* καθώς και ιοί όπως ο ιός των ανθρώπινων θηλωμάτων, ο ιός της ανθρώπινης ανοσοανεπάρκειας (HIV) και ενδογενείς ρετροϊοί (Fry et al, 2007, Morar et al, 2010).

- **Άγχος- στρες- ψυχολογικοί παράγοντες**

Στοιχεία επιβεβαιώνουν ότι η έναρξη της κατά πλάκας ψωρίασης σχετίζεται σε μεγάλο βαθμό με κάποιο αγχωτικό γεγονός στη ζωή των ασθενών (Mallbris et al, 2005). Το στρες είναι κύριος παράγοντας εμφάνισης της ψωρίασης στο 35% των ατόμων αλλά και επιδείνωσης της ήδη υπάρχουσας νόσου στο 70% των ασθενών.

- **Φάρμακα**

Ορισμένα φάρμακα όπως το λίθιο (αντικαταθλιπτικό), αντιυπερτασικά (β-αδρενεργικοί αναστολείς) καθώς και η απότομη διακοπή κορτικοστεροειδών μπορούν να πυροδοτήσουν ή να επιδεινώσουν την ψωρίαση (O' Brien et al, 2006).

- **Ήλιος**

Ο ήλιος παρά την ευεργετική δράση που έχει στην ψωρίαση, μπορεί σε ένα μικρό ποσοστό των ασθενών να οδηγήσει στην εμφάνιση ψωριασικών βλαβών. Αυτή η φωτοευαίσθητη μορφή ψωρίασης είναι πολύ σπάνια και εμφανίζεται συχνότερα σε γυναίκες και σχετίζεται με θετικό οικογενειακό ιστορικό και στο αντιγόνο HLA-Cw6 (Kirsty J Rutter et al, 2009).

- **Αλκοόλ- κάπνισμα**

Η κατανάλωση αλκοόλ και το κάπνισμα αποτελούν επιβαρυντικούς παράγοντες για την εμφάνιση και επιδείνωση της ασθένειας (Higgins E, 2000).

1.3 ΙΣΤΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Η ιστοπαθολογική εικόνα της ψωρίασης ποικίλλει ανάλογα με τη μορφή της, την ηλικία καθώς και την εντόπιση της εξεταζόμενης βλάβης. Αρχικά, υπάρχει διαστολή των τριχοειδών και οίδημα στο χόριο, με λεμφοκυτταρική περιαγγειακή διήθηση η οποία αποτελείται κυρίως από λεμφοκύτταρα αλλά και από μονοκύτταρα, μακροφάγα, ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρρηνα και μαστοκύτταρα. Από την άθροιση των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων, στην κεράτινη στιβάδα σχηματίζονται μικροαποστήματα Munro. Τα λεμφοκύτταρα εισέρχονται στο κατώτερο μέρος της επιδερμίδας όπου αναπτύσσεται σπογγίωση. Ακολουθεί μείωση ή εξαφάνιση των κυττάρων της κοκκώδους στιβάδας, υπερκεράτωση και έναρξη της παρακεράτωσης (διατήρηση των πυρήνων των κερατινοκυττάρων) (Bowcock, Krueger, 2005).

1.4 ΑΝΟΣΟΛΟΓΙΚΗ ΑΠΑΝΤΗΣΗ –ΑΝΟΣΟΠΑΘΟΓΕΝΕΙΑ ΤΗΣ ΨΩΡΙΑΣΗΣ

Η ψωρίαση θεωρείται μια πάθηση του δέρματος με αισθητά αυξημένο (5-6 φορές) ρυθμό κυτταρικού πολλαπλασιασμού.

Η ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων είναι πολύ σημαντική για τη φλεγμονή στο μικροπεριβάλλον του δέρματος. Η φλεγμονή ακολουθεί ανοσολογική απόκριση τύπου Th1.

Στην ψωρίαση, η κινητήριος δύναμη για την επαγωγή και τη διατήρηση των βλαβών του δέρματος, είναι η ενεργότητα των T κυττάρων. Τα T λεμφοκύτταρα αποτελούνται από δυο λειτουργικά διακριτούς πληθυσμούς, τα βοηθητικά T κύτταρα και τα κυτταρολυτικά T κύτταρα. Η κύρια λειτουργία των T-κυττάρων είναι να ρυθμίζουν όλες τις ανοσολογικές αποκρίσεις σε πρωτεϊνικά αντιγόνα και να δρουν για την εξάλειψη ενδοκυτταρικών μικροβίων. Τα T κύτταρα, σε αντίθεση με τα B λεμφοκύτταρα, δεν παράγουν αντισώματα, αλλά αναγνωρίζουν μόνο επεξεργασμένα πεπτιδικά αντιγόνα, τα οποία συνδέονται με τις πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από τα γονίδια MHCII.

Άρα, για την ενεργοποίησή τους, τα T κύτταρα χρειάζονται τα αντιγονοπαρουσιαστικά κύτταρα (APCs) για την επεξεργασία και παρουσίαση των πεπτιδικών θραυσμάτων στην επιφάνειά τους. Με την κατάλληλη διέγερση, τα T κύτταρα εκκρίνουν διάφορες κυτταροκίνες.

Η ενεργοποίηση των T λεμφοκυττάρων απαιτεί τρία βήματα: την πρόσδεση, την ειδική ενεργοποίηση αντιγόνου και τη μη-αντιγονική ειδική αλληλεπίδραση μεταξύ κυττάρων (Rajiv Joshi, 2004).

- **Πρόσδεση**

Το T κύτταρο συνδέεται με το αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο μέσω επιφανειακών μορίων προσκόλλησης που βρίσκονται στις κυτταρικές επιφάνειες τόσο των T κυττάρων (LFA-1 και CD2) όσο και των APCs (ICAM-1 και LFA-3).

Στο δέρμα το κύτταρο Langerhans είναι το πιο αποτελεσματικό αντιγονοπαρουσιαστικό κύτταρο.

- **Ειδική ενεργοποίηση αντιγόνου**

Μόλις πραγματοποιηθεί η σύνδεση T-κυττάρου και αντιγονοπαρουσιαστικού, το αντιγόνο παρουσιάζεται από το APC στο T κύτταρο. Τα T κύτταρα εκφράζουν τον T κυτταρικό υποδοχέα (TCR), ο οποίος αναγνωρίζει το πεπτιδικό αντιγόνο που παρουσιάζεται από το APC στην αύλακα του συμπλόκου MHC. Αυτή η ενεργοποίηση του αντιγόνου έχει ως αποτέλεσμα τη μετατροπή του ανώριμου T κυττάρου σε ένα αντιγονο-ειδικό κύτταρο που μπορεί να διαφοροποιηθεί περαιτέρω σε ένα κύτταρο μνήμης, το οποίο αναγνωρίζει το ίδιο αντιγόνο σε μεταγενέστερη μόλυνση.

- **Μη-αντιγονική ειδική αλληλεπίδραση μεταξύ κυττάρων-Συνδιέγερση**

Μετά την παρουσίαση του αντιγόνου, αν δε συμβεί η συνδιέγερση με άλλα μόρια της κυτταρικής επιφάνειας, το Τ κύτταρο δε θα ανταποκριθεί στο αντιγόνο και θα υποπέσει σε απόπτωση.

Μόλις ενεργοποιηθεί το Τ κύτταρο το επόμενο βήμα είναι η επαγωγή των φλεγμονωδών αποκρίσεων και των μεταβολών του ιστού που οδηγούν στην κλινική εικόνα της ψωρίασης. Πολλοί τύποι κυττάρων συμμετέχουν σε αυτό το στάδιο (Τ κύτταρα, μακροφάγα, δένδριτικά κύτταρα, αγγειακό ενδοθήλιο και κερατινοκύτταρα). Αυτά εκκρίνουν διάφορες κυτταροκίνες που προάγουν και διατηρούν τη φλεγμονή των ιστών. Στην ψωρίαση είναι πιθανό να εκκρίνεται μια σειρά κυτταροκινών από διάφορα κύτταρα στο τοπικό μικροπεριβάλλον. Αυτές οι κυτταροκίνες παίζουν ένα ρόλο που οδηγεί στις φαινοτυπικές αποκρίσεις που παρατηρούνται στην ψωρίαση δηλαδή αγγειακή διαστολή, δερματική φλεγμονή και επακόλουθο υπερπολλαπλασιασμό της επιδερμίδας. Οι κυτταροκίνες που εμπλέκονται στην ανάπτυξη της ψωρίασης είναι ο επιθηλιακός αυξητικός παράγοντας (EGF), IL-2, IL-8, IL-12, IL-1, IL-6, ιντερφερόνη-γ, ο παράγοντας νέκρωσης όγκου-α (TNF-α) (Rajiv Joshi, 2004).

1.5 ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΨΩΡΙΑΣΗΣ

Η κλινική εικόνα της ψωρίασης διαφέρει από άτομο σε άτομο και εξαρτάται από τη μορφή και την εντόπισή της. Γενικά, ταξινομείται στους ακόλουθους τύπους:

Α) Ψωρίαση κατά πλάκας (psoriasis vulgaris) (Εικόνες 3.α, 3.β): Είναι ο συχνότερος τύπος ψωρίασης και αφορά το 85-90% των περιπτώσεων (Palfreeman et al, 2013). Εμφανίζεται συνήθως σε ενήλικες. Αναγνωρίζεται κλινικά από τα παχιά αργυρόχρωα λέπια που οφείλονται στην κερατινοποίηση και από το ερυθρό χρώμα που οφείλεται στο ανεπτυγμένο τριχοειδικό δίκτυο. Το σχήμα των βλαβών είναι συνήθως κυκλικό, ωοειδές ή ακανόνιστο, ενώ το μέγεθος των πλακών ποικίλλει από λίγα χιλιοστά μέχρι μερικά εκατοστά (1-30). Οι μικρές βλάβες συνενώνονται και σχηματίζουν μεγαλύτερες οι οποίες μπορεί να καλύπτουν μεγάλη επιφάνεια του σώματος.

Συνηθέστερα εντοπίζεται στους αγκώνες και τα γόνατα, λόγω της συνεχούς τριβής και του τραυματισμού του δέρματος σε αυτά τα σημεία. Επίσης εμφανίζεται και στο τριχωτό της κεφαλής.

Η κοινή, κατά πλάκας ψωρίαση είναι ασυμπτωματική, αλλά μπορεί να συνοδεύεται από άλγος ή κνησμό.

Οι βλάβες της κοινής ψωρίασης μπορεί να επιμένουν για μεγάλο χρονικό διάστημα εμφανίζοντας όμως βραδεία επέκταση. Μπορεί όμως να μεταπέσουν από το στάδιο των χρόνιων πλακών σε ένα οξύ στάδιο το οποίο χαρακτηρίζεται από απότομη

εμφάνιση πλακών (εξανθηματική μορφή), πολλαπλών φλυκταινών (φλυκταινώδης μορφή) ή καθολικής ερυθρότητας και απολέπισης του δέρματος (ερυθροδερμική ψωρίαση) (<https://www.psoriasis.org/>).

Β) Ερυθροδερμική ψωρίαση ή ψωριασική ερυθροδερμία (Εικόνα 3.γ) αποτελεί την πιο σπάνια αλλά την πιο σοβαρή μορφή της ψωριασικής νόσου. Η προσβολή του δέρματος μπορεί να είναι καθολική ή μερική, αφήνοντας περιοχές μη προσβεβλημένου δέρματος. Η διάχυτη δερματική φλεγμονή μπορεί να οδηγήσει σε παροδική αλωπεκία ή σοβαρές διαταραχές ανάπτυξης των ονύχων. Η ερυθροδερμική ψωρίαση μπορεί να εμφανισθεί ξαφνικά ή να αποτελεί την ακραία μορφή μιας προϋπάρχουσας χρόνιας κοινής ή φλυκταινώδους ψωρίασης. Εμφανίζεται συνήθως σε νεαρά ή μέσης ηλικίας άτομα. Παράγοντες που ευνοούν την εμφάνιση αυτής της μορφής ψωρίασης είναι η απότομη διακοπή τοπικών ή συστηματικών κορτικοειδών, αντίδραση σε φάρμακο λοιμώξεις κ.ά. χαρακτηρίζεται από υψηλό πυρετό και ρίγη, οίδημα κάτω άκρων, διαταραχές θερμορύθμισης, υποθερμία, επιβάρυνση της καρδιακής λειτουργίας (<https://www.psoriasis.org/>).

Γ) Σταγονοειδής ψωρίαση (Guttate Psoriasis) (Εικόνα 3.δ): Εμφανίζεται σε ποσοστό <10% των περιπτώσεων ψωρίασης και κυρίως σε παιδιά και νέους ενήλικες. Παρατηρείται αμέσως μετά από στεπτοκοκκική λοίμωξη του φάρυγγα ή των αμυγδαλών. Οι πλάκες είναι μικρές, με διάμετρο < 2 εκατοστών, σαν σταγόνες και εμφανίζονται διάσπαρτα στο δέρμα, συνήθως στον κορμό, τα χέρια και τα πόδια. Οι βλάβες συνήθως υποχωρούν σύντομα με χρήση τοπικών θεραπειών και φωτοθεραπείας. Σε σπάνιες περιπτώσεις μεταπίπτουν σταδιακά σε χρόνια κοινή ψωρίαση (<https://www.psoriasis.org/>).

Δ) Φλυκταινώδης ψωρίαση (Pustular psoriasis) (Εικόνα 3.ε): Χαρακτηρίζεται από το σχηματισμό φλυκταινών. Διακρίνεται στην εντοπισμένη και στη γενικευμένη φλυκταινώδη ψωρίαση. Η *εντοπισμένη* μορφή προσβάλλει τις παλάμες και τα πέλματα. Οι φλύκταινες έχουν μέγεθος 2-8 χιλιοστά. Οι φλύκταινες έχουν κίτρινο ή καφέ χρωματισμό και σχηματίζονται πάνω σε ερυθρηματώδεις συμμετρικές πλάκες. Η μορφή αυτή προσβάλλει κυρίως γυναίκες και ενήλικες. Οι φλύκταινες περιέχουν μεγάλο αριθμό πολυμορφοπύρηνων ουδετερόφιλων, χωρίς την παρουσία παθογόνων μικροοργανισμών.

Η *γενικευμένη* μορφή είναι σπάνια και βαριά νόσος και προσβάλλει όλο το σώμα ασθενών με ήδη υπάρχουσα κοινή ψωρίαση και μπορεί να είναι απειλητική για τη ζωή. Εμφανίζονται φλύκταινες μεγέθους 1-3 χιλιοστά οι οποίες συνενώνονται σε μεγαλύτερους πυώδεις σχηματισμούς. Συνυπάρχουν πυρετός, αυξημένος αριθμός λευκών αιμοσφαιρίων, πάχυνση και πτώση των νυχιών και απώλεια τριχών.

Μερικές από τις επιπλοκές της νόσου είναι η αφυδάτωση, υποσβεσταιμία, καρδιακή ανεπάρκεια, ηπατική και νεφρική δυσλειτουργία καθώς και βακτηριακές λοιμώξεις (<https://www.psoriasis.org/>).

Ε) Ψωρίαση ειδικής εντόπισης: Όταν η νόσος εντοπίζεται σε ειδικές θέσεις τότε η κλινική εικόνα της ψωρίασης εμφανίζει ιδιομορφίες.

- **Τριχωτό κεφαλής** (Εικόνα 3.στ): Η προσβολή του τριχωτού της κεφαλής αποτελεί την πρώτη διαγνωστική εκδήλωση της νόσου. Συμμετρικές πλάκες εμφανίζονται στην ινιακή χώρα και πίσω από τα αυτιά. Η φλεγμονή και τα λέπια περιβάλλουν τις ρίζες των τριχών χωρίς να προκαλείται αλωπεκία.
- **Ανάστροφη ψωρίαση (Ψωρίαση πτυχών)** (Εικόνα 3.ζ): Προσβάλλει τις πτυχές του δέρματος (μεσογλουτιαία, μηροβουβωνικές, υπομαζικές, μασχαλιαίες και οπισθοωτιαία) και χαρακτηρίζεται από ερυθριματώδεις, λείες πλάκες χωρίς λέπια. Είναι συχνότερη σε μεγαλύτερες ηλικίες και σε παχύσαρκα άτομα λόγω της έντονης τριβής του δέρματος (*φαινόμενο Koebner*). Οι πλάκες σε αυτή τη μορφή ψωρίασης μολύνονται από μύκητα *Candida-Albicans*.
- **Όνυχες** (Εικόνα 3.η): 25-50% των ψωριασικών ασθενών εμφανίζουν προσβολή των ονύχων. Η πιο συχνή εκδήλωση της νόσου είναι τα βοθρία και η υπερκεράτωση των νυχιών.

ΣΤ) Ψωριασική αρθρίτιδα (Εικόνα 3.θ): Εμφανίζεται στο 10-30% των ψωριασικών ασθενών. Η εμφάνιση των συμπτωμάτων της δερματικής ψωρίασης προηγείται αυτής των συμπτωμάτων της αρθρίτιδας στο 65% των ασθενών, εμφανίζεται ταυτόχρονα στο 16% και έπεται στο 19% των ασθενών. Προσβάλλει εξίσου και τα δύο φύλα και εμφανίζεται συχνότερα σε μεγαλύτερες ηλικίες (>40 ετών) (Jung-Tai Liu et.al, 2014). Χωρίζεται σε 5 τύπους ανάλογα με τις αρθρώσεις που προσβάλλει:

1. Ασύμμετρη ολιγοαρθρίτιδα
2. Άπω μεσοφαλαγγική αρθρίτιδα
3. Συμμετρική πολυαρθρίτιδα
4. Παραμορφωτική αρθρίτιδα
5. Σπονδυλίτιδα



Εικόνα 3: Οι τύποι ψωρίασης: α,β) Ψωρίαση κατά πλάκας, γ) Ερυθροδερμική ψωρίαση, δ) Σταγονοειδής ψωρίαση, ε) Φλυκταινώδης ψωρίαση, στ) Ψωρίαση τριχωτού κεφαλής, ζ) Ανάστροφη ψωρίαση, η) Ψωρίαση ονύχων, θ) Ψωριασική αρθρίτιδα (<https://www.psoriasis.org/>).

1.6 ΔΙΑΓΝΩΣΗ-ΔΙΑΦΟΡΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ

Η διάγνωση της ψωρίασης γίνεται με φυσική εξέταση του δέρματος, του τριχωτού της κεφαλής και των νυχιών καθώς και με λήψη ατομικού και οικογενειακού ιατρικού ιστορικού.

Σπανιότερα, γίνεται και βιοψία δέρματος και εξέταση στο μικροσκόπιο ώστε να προσδιοριστεί ο ακριβής τύπος ψωρίασης και να αποκλειστεί η ύπαρξη κάποιας άλλης διαταραχής.

Η διάγνωση της ψωρίασης βασίζεται σχεδόν αποκλειστικά στην κλινική εικόνα. Δεν υπάρχουν βιοχημικοί δείκτες στο αίμα που θα μας οδηγήσουν στη διάγνωση της μέσω εργαστηριακών εξετάσεων. Η διαφοροδιάγνωση γίνεται συχνά με σύγκριση των τιμών συγκεκριμένων κυτταροκινών στο αίμα ψωριασικών ασθενών.

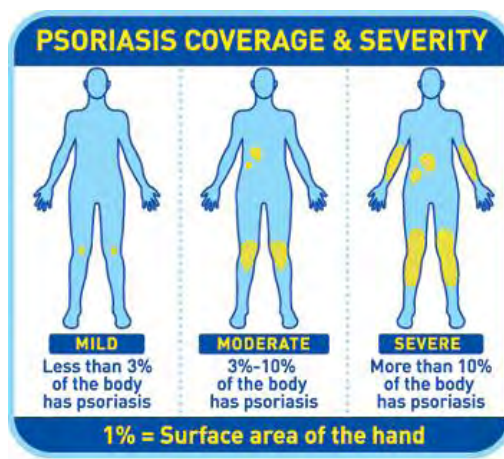
1.7 ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗ ΤΗΣ ΒΑΡΥΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΝΟΣΟΥ

Οι παράμετροι που χρησιμοποιούνται για να περιγράψουν τη βαρύτητα της νόσου και την ανταπόκριση στη θεραπεία είναι οι εξής (Mrowietz et al, 2011, Krueger et al, 2000, Κοσμαδάκη και συν., 2007)

- **BSA-Body Surface Area- Ποσοστό επιφάνειας σώματος με ψωριασικές βλάβες**

Ήπια (mild) θεωρείται η ψωρίαση που αφορά επιφάνεια μικρότερη του 3% του σώματος, μέτρια (moderate) όταν αφορά επιφάνεια 3-10% του σώματος και σοβαρή (severe) όταν αφορά επιφάνεια μεγαλύτερη του 10% του σώματος (Εικόνα 4).

(Η παλάμη του χεριού αντιπροσωπεύει το 1% της επιφάνειας του σώματος).



Εικόνα 4: Ποσοστό σώματος με ψωριασικές βλάβες και σοβαρότητα νόσου.

- **PGA- Physician's Global Assessment**

Αξιολογεί το ερύθημα, τη διήθηση και την απολέπιση σε όλες τις βλάβες

Τιμές 0-4 δείχνουν τη βαρύτητα των συμπτωμάτων

- **PASI- Psoriasis Area and Severity Index- Δείκτης Έκτασης και Βαρύτητας**

Αξιολογεί τη νόσο βάσει των μορφολογικών χαρακτηριστικών.

Ο συγκεκριμένος δείκτης επιτρέπει την αξιολόγηση της έκτασης των βλαβών καθώς και του βαθμού του ερυθήματος και των βλαβών.

Έχει τιμές από 0 έως 75. Υψηλές τιμές του δείκτη υποδηλώνουν σοβαρή μορφή ψωρίασης. PASI 75 σημαίνει 75% βελτίωση του αρχικού PASI σε συγκεκριμένη χρονική στιγμή μετά από συγκεκριμένη θεραπεία.

Η σοβαρότητα κάθε περίπτωσης ψωρίασης εξαρτάται και από την επίπτωση που μπορεί να έχει στην ποιότητα ζωής και όχι αποκλειστικά από τα μορφολογικά κριτήρια και την έκταση των βλαβών. Η αξιολόγηση του αντίκτυπου της ψωρίασης στην ποιότητα ζωής είναι πολύ σημαντική καθώς καθορίζει τη θεραπεία που θα δοθεί στον κάθε ασθενή. Η επιρροή της ψωρίασης στην ποιότητα ζωής του ασθενούς καθορίζεται από το δείκτη ποιότητας ζωής- **DLQI**- Dermatology Life Quality Index. Συνολικά, η σοβαρότητα της νόσου καθορίζεται από το συνδυασμό όλων των παραμέτρων.

Καθορισμός **ήπιας** κατά πλάκας ψωρίασης: **BSA \leq 10 και PASI \leq 10 και DLQI \leq 10**

Καθορισμός **μέτριας-σοβαρής** ψωρίασης: **(BSA > 10 ή PASI > 10) και DLQI > 10**

1.8 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΨΩΡΙΑΣΗΣ ΜΕ ΑΛΛΑ ΝΟΣΗΜΑΤΑ

Οι ασθενείς που πάσχουν από ψωρίαση παρουσιάζουν αυξημένη συχνότητα, σε σχέση με το γενικό πληθυσμό, νοσημάτων όπως η στεφανιαία νόσος, ο σακχαρώδης διαβήτης, η υπέρταση, η κατάθλιψη, η νόσος Crohn κ.λ.π. (Sanjeev J Aurangabadkar, 2013).

Οι Onumah et al. (2012), παρατήρησαν ότι η σοβαρότητα της ψωρίασης του δέρματος προμηνύει σοβαρό κίνδυνο ανάπτυξης αυτών των συνοδών νοσημάτων και οι ασθενείς με μέτρια έως σοβαρή ψωρίαση έχουν μεγαλύτερη εμφάνιση νοσημάτων με συναφείς παθογενετικούς μηχανισμούς.

Οι συννοσηρότητες μπορεί επίσης να αυξάνονται με την ηλικία, καθώς, σύμφωνα με μία πρόσφατη μελέτη, ασθενείς ηλικίας άνω των 65 ετών είχαν στατιστικά υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης υπέρτασης, υπερτροφίας της αριστερής κοιλίας, σακχαρώδη διαβήτη και αυξημένα επίπεδα γλυκόζης στο αίμα σε σχέση με μη προσβεβλημένα άτομα (Fernandez-Torres et al, 2012).

Η συννοσηρότητα προστιθέμενη στην επιβάρυνση της νόσου υποβιβάζει την ποιότητα ζωής και λαμβάνεται υπόψη για τον καθορισμό της θεραπείας.

1.9 ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Το θεραπευτικό σχήμα το οποίο επιλέγεται για ασθενείς με ψωρίαση, εξαρτάται βάσει της βαρύτητας της νόσου, της ηλικίας και του φύλου του ασθενή. Επίσης λαμβάνονται υπ' όψιν συνοδά νοσήματα, το επάγγελμα, οι ιδιαίτερες ανάγκες και η ψυχολογική επίδραση της νόσου στον ασθενή.

Ως θεραπεία για την ψωρίαση χρησιμοποιούνται είτε τοπικές θεραπείες, είτε φωτοθεραπεία, είτε βιολογικοί παράγοντες, είτε συστηματικές θεραπείες.

1.9.1 Τοπικές θεραπείες

Η τοπική θεραπεία χρησιμοποιείται για όλες τις μορφές ψωρίασης. Δίνεται ως μονοθεραπεία σε νόσο περιορισμένης έκτασης ή σε συνδυασμό με άλλα θεραπευτικά μέσα όπως φωτοθεραπεία και συστηματική αγωγή σε ασθενείς με νόσο μεγαλύτερης έκτασης ή σοβαρότητας.

Οι κυριότεροι τοπικοί παράγοντες είναι:

- Τοπικά κορτικοστεροειδή

Τα τοπικά κορτικοστεροειδή αποτελούν κρέμες ή μίγματα κορτιζόνης διαφορετικής ισχύος. Ασκούν αντιφλεγμονώδη, αγγειοσυσπαστική και αντικνησμόδη δράση. Μπορεί να βελτιώσουν τις βλάβες στο 45- 89% των ασθενών ανάλογα με την ισχύ τους. Η μακροχρόνια χρήση τους μπορεί να προκαλέσει τοξικότητα (Lebwohl et al, 2005).

- Παράγωγα βιταμίνης D

Στα παράγωγα της βιταμίνης D περιλαμβάνονται τρεις ουσίες που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία της ψωρίασης, η καλσιποτριόλη, η καλσιτριόλη και η τακαλισιτόλη.

Δρουν ρυθμίζοντας τον πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη των επιδερμικών κυττάρων και αναστέλλοντας τη φλεγμονή προάγοντας τη φυσιολογική κερατινοποίηση. Υψηλές δόσεις μπορεί να προκαλέσουν υπερασβεσταιμία (O'Neill J. et al, 2010).

- Τοπικά ρετινοειδή

Αποτελούν παράγωγα της βιταμίνης A και δρουν ρυθμίζοντας τον πολλαπλασιασμό και τη διαφοροποίηση των επιδερμικών κυττάρων.

Η ταζαροτένη είναι συνθετικό ρετινοειδές και επιδρά κυρίως στην απολέπιση και διήθηση των ψωριασικών βλαβών. Η κυριότερη παρενέργεια των τοπικών στεροειδών είναι η ερυθρότητα (Lebwohl et al, 2005).

- Ανθραλίνη: Είναι ένας ισχυρός αντιφλεγμονώδης καθώς και αντιμυτωτικός παράγοντας με μειωμένη χρήση λόγω του δερματικού ερεθισμού που προκαλεί.
- Σκευάσματα πίσσας: χρησιμοποιούνται σε διάφορες συγκεντρώσεις μέσα σε λιπαρά έκδοχα υπό μορφή σαμπουάν.

1.9.2 Φωτοθεραπεία

Η έκθεση στο φάσμα της υπεριώδους ακτινοβολίας έχει καθιερωθεί ως μια αποτελεσματική θεραπεία για τη σταγονοειδή και την κατά πλάκας ψωρίαση.

Υπάρχουν δύο είδη φωτοθεραπείας. Η φωτοθεραπεία με υπεριώδη ακτινοβολία Β (UVB) και η φωτοχημειοθεραπεία (PUVA).

Η ακτινοβολία UVB (290-320nm) προκαλεί σειρά από βλάβες στο κυτταρικό DNA που έχουν ως αποτέλεσμα να επιβραδύνεται η ταχεία αύξηση των κερατινοκυττάρων.

Μπορεί να προκαλέσει κάθαρση της ψωρίασης στο 70% των ασθενών. Ωστόσο, η φωτοθεραπεία δε χρησιμοποιείται ευρέως καθώς μπορεί να προκαλέσει ερεθισμό του δέρματος ακόμη και καρκίνο του δέρματος (National Psoriasis Foundation, 2014).

Κατά τη φωτοχημειοθεραπεία χορηγούνται- είτε από στόματος είτε τοπικά- ουσίες, γνωστές ως ψωραλένια και στη συνέχεια το δέρμα του ασθενούς εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία Α (320-400nm). Με την επίδραση της ακτινοβολίας UVA προκαλείται μια φωτοχημική αντίδραση μεταξύ των ψωραλενίων και των νουκλεοτιδίων των κερατινοκυττάρων. Με αυτό τον τρόπο, σχηματίζονται χημικά συμπλέγματα μεταξύ των ελίκων του DNA που αναστέλλουν το διπλασιασμό του και άρα και τον πολλαπλασιασμό των κερατινοκυττάρων (Weischer et al, 2004).

1.9.3 Βιολογικοί παράγοντες

Χρησιμοποιούνται στη θεραπεία της μέτριας ως σοβαρής ψωρίασης σε ασθενείς που δεν ανταποκρίνονται ή δεν ανέχονται άλλες συστημικές θεραπείες συμπεριλαμβανομένων της κυκλοσπορίνης, της μεθοτρεξάτης και της φωτοθεραπείας. Οι βιολογικοί παράγοντες δρουν είτε στοχεύοντας σε Τ κύτταρα, είτε αναστέλλοντας προ-φλεγμονώδεις κυτταροκίνες (Sullivan et al, 2009).

Οι εγκεκριμένοι βιολογικοί παράγοντες για την ψωρίαση χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες, ανάλογα με το μηχανισμό δράσης τους: α. ουσίες που στοχεύουν στον παράγοντα νέκρωσης όγκων (TNF-α) όπως το infliximab, το etanercept και το adalimumab, β. ουσίες έναντι των ιντερλευκινών 12 και 23 όπως το ustekinumab και γ. παράγοντες που συμμετέχουν στην ενεργοποίηση και τη μετανάστευση των Τ-κυττάρων όπως το alefacept και το efalizumab (Sivamani et al, 2010).

- Το **etanercept** είναι πρωτεΐνη σύντηξης του εξωκυττάριου τμήματος του υποδοχέα p75 του TNF-α με την περιοχή Fc της ανθρώπινης ανοσοσφαιρίνης IgG1. Δεσμεύει τον TNF και τον καθιστά βιολογικά ανενεργό. Συνδέεται ισχυρότερα με μόρια TNF που βρίσκονται σε διαλυτή μορφή σε σχέση με τα προσδεμένα στην κυτταρική μεμβράνη, με αποτέλεσμα να δεσμεύει την περίσσεια του TNF. Δεν προκαλεί ενεργοποίηση του συμπληρώματος ή λύση των Τ-κυττάρων *in vitro* και επομένως δεν καταστρέφει τα ανοσολογικά κύτταρα αλλά απενεργοποιεί το τελικό τους προϊόν, τον TNF (Jennifer K Tan et al, 2007).
- Το **infliximab** είναι ένα χημειοκίνο μονοκλωνικό αντίσωμα ανθρώπου και επίμυος έναντι του TNF-α που αδρανοποιεί το διαλυτό TNF-α και αναστέλλει το συνδεδεμένο TNF-α στις κυτταρικές μεμβράνες (Dubois-Declerc S et al, 2013).
- Το **adalimumab** είναι ένα ανθρωποποιημένο μονοκλωνικό αντίσωμα εναντίον του TNF-α. Προσδένεται στον TNF και εμποδίζει την πρόσδεσή του στους υποδοχείς p55 και p75 (Weinblatt et al, 2003).
- Το **ustekinumab** είναι ένα πλήρως ανθρώπινο μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι των IL-12 και IL-23. Συνδέεται με υψηλή συγγένεια πρόσδεσης και ειδικότητα στην πρωτεϊνική υπομονάδα p40 των IL-12 και IL-23 αναστέλλοντας τη δραστηριότητά τους και εμποδίζοντας αυτές τις κυτταροκίνες να συνδεθούν με τον πρωτεϊνικό υποδοχέα τους IL-12Rβ1 που εκφράζεται στην επιφάνεια των ανοσοκυττάρων. Έτσι εμποδίζει τις IL-12 και IL-23 να ενεργοποιήσουν τα Τ λεμφοκύτταρα (Dubois-Declerc et al, 2013).
- **Alefacept**
Ήταν ο πρώτος βιολογικός παράγοντας που εγκρίθηκε το 2003 για τη θεραπεία της μέτριας έως σοβαρής χρόνιας ψωρίασης κατά πλάκας. Είναι μια ανασυνδυασμένη διμερική πρωτεΐνη σύντηξης που αποτελείται από το εξωκυτταρικό τμήμα του ανθρώπινου λεμφοκυτταρικού αντιγόνου-3 (LFA-3), που συνδέεται με το τμήμα Fc της ανθρώπινης IgG1 (www.fda.gov).
Το Alefacept συνδέεται με το μόριο CD2 στην επιφάνεια των Τ-λεμφοκυττάρων, αναστέλλοντας έτσι την αλληλεπίδραση του LFA-3 των αντιγονοπαρουσιαστικών κυττάρων με τον CD2. Έτσι αναστέλλεται η ενεργοποίηση και ο πολλαπλασιασμός των Τ-λεμφοκυττάρων (Virendra N Sehgal et al, 2014).

- **Efalizumab**

Το efalizumab είναι ένα εξανθρωπισμένο μονοκλωνικό αντίσωμα, που δεσμεύεται στην υπομονάδα CD11a του αντιγόνου των λευκοκυττάρων LFA-1 και εμποδίζει την αλληλεπίδραση των LFA1-ICAM-1. Το ICAM-1 είναι ένα μόριο προσκόλλησης που βρίσκεται στο αγγειακό ενδοθήλιο και συμβάλλει στην μετανάστευση των λεμφοκυττάρων. Το efalizumab, αποτρέποντας τη σύνδεση του LFA-1 με το ICAM-1, αναστέλλει την προσκόλλησή των λεμφοκυττάρων με τα ενδοθηλιακά κύτταρα, αποτρέποντας έτσι την μετανάστευσή τους στο δέρμα (Virendra N Sehgal et al, 2014).

1.9.4 Συστημική θεραπεία

Μέτρια έως σοβαρή μορφή ψωρίασης, ψωρίαση με συχνές εξάρσεις, ψωρίαση που επηρεάζει τον τρόπο ζωής των ασθενών καθώς και ψωρίαση σε εμφανή σημεία απαιτεί χορήγηση συστημικής θεραπείας για τον έλεγχο της νόσου.

- **Μεθοτρεξάτη**

Η μεθοτρεξάτη χρησιμοποιείται από το 1958 για τη θεραπεία της μέτριας και σοβαρής κατά πλάκας ψωρίασης. Είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική στην αντιμετώπιση της ερυθροδερμικής, της φλυκταινώδους ψωρίασης καθώς και της ψωριασικής αρθρίτιδας. Συνήθως χρησιμοποιείται ως μακροπρόθεσμη θεραπεία συντήρησης.

Η μεθοτρεξάτη αποτελεί ανάλογο του φυλλικού οξέος, δρα ως ανταγωνιστής της αναγωγής του διυδροφυλλικού οξέος και αναστέλλει τη σύνθεση του DNA και RNA, επιδρώντας στη φάση S του κυτταρικού κύκλου. Έτσι, τροποποιεί την κυτταρική αντίδραση επιδρώντας κυτταροτοξικά στα ταχέως πολλαπλασιαζόμενα κύτταρα της ψωριασικής επιδερμίδας και στα ενεργοποιημένα λεμφοκύτταρα του χορίου. Επίσης, δρα ως αντιφλεγμονώδες μέσω της μείωσης των CD8+ T λεμφοκυττάρων (Weinstein et al, 1971). Η μακροχρόνια χρήση της μπορεί να προκαλέσει ηπατική βλάβη.

- **Κυκλοσπορίνη**

Ανακάλυψη και πρώτες κλινικές χρήσεις

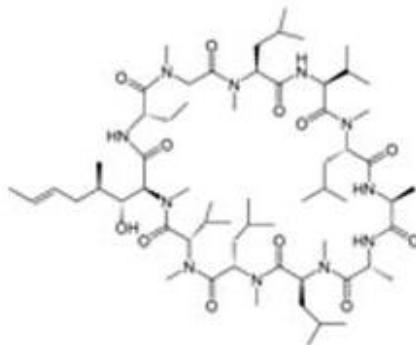
Η κυκλοσπορίνη απομονώθηκε το 1970 από το μύκητα *Tolypocladium inflatum* Gams (Petcher et al, 1976).

Το 1979 οι Hermann και Mueller παρατήρησαν ότι η χορήγηση κυκλοσπορίνης σε ασθενείς που είχαν κάνει μεταμόσχευση οι οποίοι έπασχαν από ψωριασική αρθρίτιδα, βελτίωσε ταυτόχρονα και τη φλεγμονή στις αρθρώσεις αλλά και το δερματικό τους εξάνθημα (Mueller, 1979).

Στη συνέχεια μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, τεκμηριώνουν την αποτελεσματικότητα της κυκλοσπορίνης σε πολλές αυτοάνοσες διαταραχές συμπεριλαμβανομένης της ρευματοειδούς αρθρίτιδας της ψωριασικής αρθρίτιδας αλλά και της δερματικής ψωρίασης. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα, το 1997, η κυκλοσπορίνη να εγκριθεί από τον FDA για τη θεραπεία της ψωρίασης (E. M. Prodanovic and N. J. Korman, 2008).

Μηχανισμός δράσης

Η κυκλοσπορίνη είναι ένα ισχυρά υδρόφοβο ολιγοπεπτίδιο 11 αμινοξέων και η χημική δομή της φαίνεται στην Εικόνα 5.



Εικόνα 5: Χημική δομή κυκλοσπορίνης.

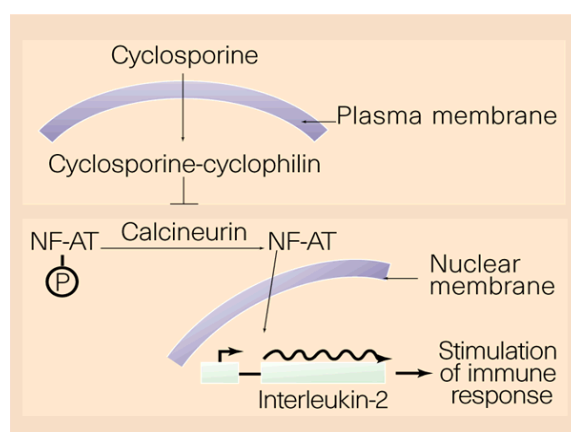
Η κυκλοσπορίνη ήταν το πρώτο ανοσοκατασταλτικό φάρμακο το οποίο είχε τη δυνατότητα ανοσορύθμισης των Τ-λεμφοκυττάρων χωρίς υπερβολική τοξικότητα και μυελοκαταστολή.

Η κυκλοσπορίνη καταστέλλει ταυτόχρονα την έκφραση και την παραγωγή πολλών φλεγμονωδών δραστικών μορίων δρώντας σε ένα ευρύ θεραπευτικό ανοσολογικό και βιοχημικό φάσμα.

Κατά την ανοσολογική απόκριση του οργανισμού, η ενεργοποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων ακολουθείται από την εισροή ιόντων ασβεστίου. Αν η ενεργοποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων είναι αρκετά ισχυρή ώστε να αυξήσει την ενδοκυττάρια συγκέντρωση ιόντων ασβεστίου πάνω από ένα συγκεκριμένο όριο, τότε το ασβέστιο και η καλμοδουλίνη συνδέονται με την καλσινευρίνη, μια ασβέστιο-καλμοδουλίνο-εξαρτώμενη-φωσφατάση. Η καλσινευρίνη αποφωσφορυλιώνει το μεταγραφικό παράγοντα NF-AT (Nuclear Factor of activated T cells-πυρηνικός παράγοντας ενεργοποίησης Τ-λεμφοκυττάρων). Στη συνέχεια ο μεταγραφικός παράγοντας μεταφέρεται στον πυρήνα όπου ενεργοποιεί τη μεταγραφή διαφόρων γονιδίων που συμμετέχουν στην ανοσολογική απόκριση (π.χ: IL-2) (E. M. Prodanovic and N. J. Korman, 2008).

Η κυκλοσπορίνη δρα σε μοριακό επίπεδο δημιουργώντας σύμπλοκο με μια κυτταροπλασματική πρωτεΐνη, την κυκλοφιλίνη. Αυτό το σύμπλοκο συνδέεται με την καλσινευρίνη την οποία και αναστέλλει εκλεκτικά. Η αναστολή της καλσινευρίνης έχει ως επακόλουθο την αναστολή των μεταγραφικών παραγόντων NFAT και AP-1 στα Τ-λεμφοκύτταρα λόγω μη-αυτοφωσφορυλίωσης. Αποτέλεσμα αυτών είναι η περαιτέρω αναστολή της μεταγραφής και της έκφρασης μιας σειράς γονιδίων κυτταροκινών που σχετίζονται με την ενεργοποίηση των Τ-λεμφοκυττάρων, όπως η ιντερλευκίνη-2, ο παράγοντας νέκρωσης TNF-α, η IL-3, IL-4, η ιντερφερόνη-γ (INF-γ), που οδηγεί σε αναστολή της διαφοροποίησης και του πολλαπλασιασμού των Τ-κυττάρων (E. M. Prodanovic and N. J. Korman, 2008).

Η ιντερλευκίνη-2 είναι μια γλυκοπρωτεΐνη, η οποία συντίθεται και εκκρίνεται από τα ενεργοποιημένα Τ-λεμφοκύτταρα και ειδικότερα τα $CD4^+$ T_H κύτταρα και κατέχει μείζονα ρόλο στην παθογένεια της ψωρίασης (Fantini et al, 2006).



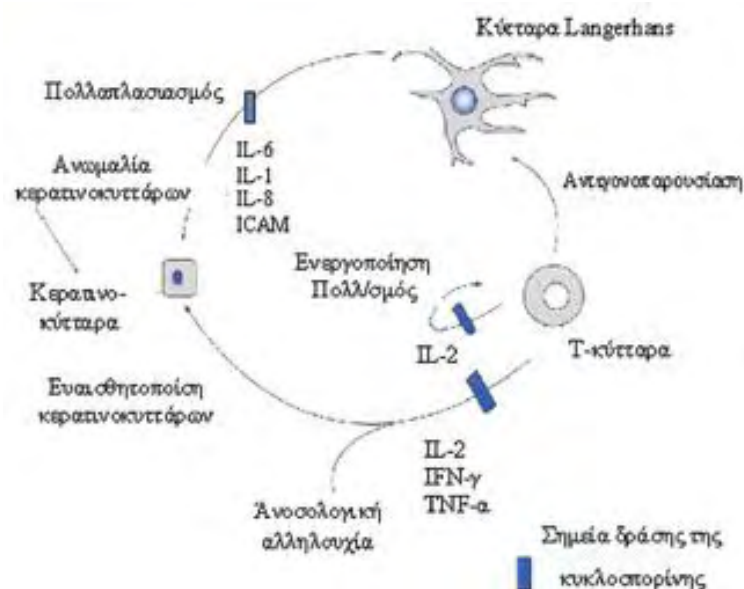
Εικόνα 6: Απλοποιημένο μοντέλο του μηχανισμού δράσης της κυκλοσπορίνης. Το σύμπλεγμα CsA-Cyp-καλσινευρίνη εμποδίζει τη μετατόπιση του NF-AT τον πυρήνα. Η μετατόπιση του NF-AT είναι απαραίτητη για τη μεταγραφή της IL-2 (Nabel, 1999).

Επιπρόσθετα, η κυκλοσπορίνη αναστέλλει την απελευθέρωση ισταμίνης από τα μαστοκύτταρα και μειώνει την έκφραση διαφόρων κυτταρικών μορίων προσκόλλησης (ICAM) ενισχύοντας με αυτό τον τρόπο την αντιφλεγμονώδη δράση της. Η μειωμένη έκφραση των μορίων προσκόλλησης του ενδοθηλίου του δερματικού αγγειακού πλέγματος στις ψωριασικές βλάβες μειώνει την κυτταρική διήθηση τόσο από τα T-λεμφοκύτταρα όσο και από τα πολυμορφοπύρρηνα ουδετερόφιλα (Ho, 2004).

Επιπλέον, η κυκλοσπορίνη έχει μελετηθεί ότι επιδρά ανασταλτικά και στα αντιγονο-παρουσιαστικά κύτταρα, όπως τα Langerhans και τα δενδριτικά κύτταρα, τα οποία κατέχουν κυρίαρχο ρόλο στην ενεργοποίηση των T-λεμφοκυττάρων.

Τέλος, κάποιες μελέτες έδειξαν νέους μηχανισμούς δράσης της κυκλοσπορίνης μέσω αναστολής των Th1 και Th17 (Haider et al, 2008).

Η κυκλοσπορίνη χρησιμοποιείται ως θεραπεία για την ψωρίαση γιατί η χρήση της συνδέεται με: α) αναστολή της σύνθεσης κυτταροκινών τύπου Th1 (IL-2, IFN- γ , TNF- α), β) παρεμπόδιση της διαφοροποίησης και του πολλαπλασιασμού των τύπου Th1 T-λεμφοκυττάρων (μέσω κυρίως της αναστολής σύνθεσης της IL-2), και γ) αναστολή της συνδιέγερσης σε επίπεδο μορίων προσκόλλησης (LFA1-ICAM).



Εικόνα 7: Σημεία δράσης της κυκλοσπορίνης.

Οι κυριότερες ενδείξεις χορήγησης της κυκλοσπορίνης είναι οι ακόλουθες (Griffiths et al, 2004):

- PASI>10, BSA>10, DLQI>10
- Οξεία ενεργός μορφή ψωρίασης
- Χρόνια ανθεκτική μορφή ψωρίασης στη τοπική ή άλλη αγωγή
- Έντονα ψυχολογικά προβλήματα ανεξαρτήτου θεραπευτικής αγωγής
- Διάφορες ειδικές μορφές ψωρίασης: Ερυθροδερμική, φλυκταινώδης, ψωριασική αρθρίτιδα, ψωρίαση ονύχων

Η κυκλοσπορίνη συνήθως χορηγείται ως βραχυπρόθεσμη θεραπεία (<12-16 εβδομάδες) και μπορεί να επαναληφθεί ανά τακτά χρονικά διαστήματα. Αυτό το διακοπτόμενο σχήμα έχει το πλεονέκτημα ότι ελαχιστοποιεί τις παρενέργειες γιατί η συνολική δόση/έκθεση στο φάρμακο είναι ελαττωμένη. Η πιο μακροπρόθεσμη συνεχής θεραπεία πρέπει να χρησιμοποιείται μόνο σε ασθενείς με σοβαρή νόσο, που δεν ελέγχονται από κανένα άλλο φάρμακο ή που υποτροπιάζουν αμέσως μετά τη διακοπή του φαρμάκου.

Η κυκλοσπορίνη υπερέχει σε σύγκριση με τα υπόλοιπα ανοσοκατασταλτικά φάρμακα καθώς δεν είναι μυελοτοξική, έχει ταχεία δράση, είναι εύκολη στη χρήση της, δεν είναι μεταλλαξιογόνος και δεν προκαλεί βλάβες στο DNA, δεν επηρεάζει τη γονιμότητα και τέλος δε συσσωρεύεται στον οργανισμό (φαινόμενο ταχυφυλαξίας).

Οι ανεπιθύμητες ενέργειες της κυκλοσπορίνης είναι γνωστές, προβλέψιμες και αντιμετωπίσιμες ενώ η εμφάνισή τους σχετίζεται με το ύψος της χορηγούμενης δόσης (Griffiths et al, 2000).

Η κυκλοσπορίνη μπορεί να προκαλέσει οξεία ή χρόνια νεφρική βλάβη και αρτηριακή υπέρταση. Επίσης μπορεί να εμφανιστούν τρόμος, κεφαλαλγία, διαταραχές μεταβολισμού (ήπια και ασυμπτωματική υπομαγνησιαιμία και υπερκαλιαιμία καθώς και αυξήσεις στη συγκέντρωση του ουρικού οξέος), διαταραχές του γαστρεντερικού συστήματος, υπερπλασία ουλών, κόπωση, τριχόπτωση (Ho VC et al, 2004).

Επίσης, η κυκλοσπορίνη αυξάνει τον κίνδυνο για εμφάνιση επιθηλιωμάτων του δέρματος, ιδιαίτερα σε ασθενείς που έχουν λάβει θεραπεία με PUVA.

Η κυκλοσπορίνη χαρακτηρίζεται από μικρό θεραπευτικό εύρος και εξαιρετικά μεταβλητή φαρμακοκινητική, γεγονός που καθιστά απαραίτητη την παρακολούθηση του επιπέδου του φαρμάκου (therapeutic drug monitoring: TDM) (Moes et al, 2014).

Η προσέγγιση αυτή συνίσταται στην παρακολούθηση της συγκέντρωσης των φαρμάκων στο αίμα και στη ρύθμιση της δόσης ώστε να καθοριστούν οι επιθυμητές συγκεντρώσεις με σκοπό τη μικρότερη δυνατή τοξικότητα και το βέλτιστο ανοσοκατασταλτικό αποτέλεσμα (Klupp et al, 2002).

1.10 ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ ΤΩΝ ΑΝΑΣΤΟΛΕΩΝ ΚΑΛΣΙΝΕΥΡΙΝΗΣ

Η φαρμακοκινητική της κυκλοσπορίνης (και του tacrolimus) χαρακτηρίζεται από μεταβλητή, απρόβλεπτη και γενικά μικρή βιοδιαθεσιμότητα μετά από χορήγηση από του στόματος (Duricová et al, 2007). Μετά από την απορρόφηση στο έντερο, και τα δύο φάρμακα δεσμεύονται σε πρωτεΐνες του πλάσματος σε μεγάλο βαθμό και μεταβολίζονται από το ήπαρ και το έντερο προς 15-30 διαφορετικούς μεταβολίτες. Απεκκρίνονται κυρίως μέσω της χολής, καθώς η νεφρική κάθαρση αντιστοιχεί σε <1% και σε 6% της ολικής σωματικής κάθαρσης για το tacrolimus και την κυκλοσπορίνη αντίστοιχα.

Η γλυκοπρωτεΐνη διαπερατότητας (P-γλυκοπρωτεΐνη) και τα ισοένζυμα CYP3A4 και CYP3A5 παίζουν βασικό ρόλο στην κατανομή των δύο αυτών φαρμάκων.

Εκτός από την έντονα μεταβλητή βιοδιαθεσιμότητα από του στόματος, η φαρμακοκινητική των αναστολέων καλσινευρίνης χαρακτηρίζεται από μεγάλη ποικιλότητα μεταξύ ατόμων ως προς το μεταβολισμό πρώτης διέλευσης και τη συστηματική κάθαρση. Μεγάλο μέρος αυτών των διαφορών στη φαρμακοκινητική μεταξύ των διαφόρων ατόμων αποδίδεται πλέον στις διαφορές της δραστηριότητας της P-γλυκοπρωτεΐνης και του CYP3A (Kawachi et al, 2014).

1.10.1 P-γλυκοπρωτεΐνη

Η P-γλυκοπρωτεΐνη αποτελείται από μια αλυσίδα 1280 αμινοξέων που παράγεται από το γονίδιο *MDR1* (γνωστό και ως *ABCB1*), που βρίσκεται στο χρωμόσωμα 7q21.1 και ανήκει στην οικογένεια των μεμβρανικών μεταφορέων με κασέτα δέσμευσης της τριφωσφορικής αδενοσίνης (ATP-binding cassette, ABC). Η P-γλυκοπρωτεΐνη είναι ένας μεταφορέας που εξαρτάται από την ATP και που μπορεί να μεταφέρει πολλές ενδογενείς ουσίες καθώς και μεγάλη ποικιλία φαρμάκων, όπως η κυκλοσπορίνη, από το κυτταρόπλασμα ή την κυτταρική μεμβράνη στον εξωκυττάριο χώρο (Schwab et al, 2003).

Η P-γλυκοπρωτεΐνη εκφράζεται στο ήπαρ, στον νεφρό, στο πάγκρεας και στην επιφάνεια των ώριμων εντεροκυττάρων του λεπτού εντέρου και του κόλου. Η ειδικότητα της έκφρασης της P-γλυκοπρωτεΐνης δείχνει ότι λειτουργεί ως προστατευτικός φραγμός, αποβάλλοντας ενεργητικά τους μεταβολίτες και τις ξενοβιοτικές ουσίες από το εσωτερικό του κυττάρου προς τη χολή, τα ούρα και το έντερο (Sakaeda et al, 2003).

1.10.2 Κυτόχρωμα P450

Το σύστημα του κυτοχρώματος P450, μιας ενζυμικής οικογένειας που περιλαμβάνει περισσότερα από 50 ισοένζυμα, επιτελεί τον οξειδωτικό μεταβολισμό μια μεγάλης ποικιλίας ενδογενών και εξωγενών ουσιών (Guengerich et al, 1999). Η υποοικογένεια CYP3A αντιπροσωπεύει το μεγαλύτερο ποσοστό της πρωτεΐνης CYP στο ανθρώπινο ήπαρ και μεταβολίζει πάνω από το 50% όλων των φαρμάκων που χρησιμοποιούνται (μεταξύ αυτών την κυκλοσπορίνη) (Ekins et al, 2003).

Η υποοικογένεια CYP3A περιλαμβάνει τα ισοένζυμα CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7 και το CYP3A43. Τα CYP3A4 και CYP3A5 θεωρούνται τα σημαντικότερα από τα μέλη της οικογένειας CYP3A, βάσει της ποσότητας κάθε πρωτεΐνης στον οργανισμό και άρα της υπολογιζόμενης συμβολής τους στη συνολική δραστηριότητα CYP3A. Το γονίδιο *CYP3A4* εκφράζεται σταθερά ήπαρ, τη νήστιδα, το κόλο, τους νεφρούς και το πάγκρεας, αν και υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ ατόμων ως προς τα επίπεδα έκφρασης στο ήπαρ και στο έντερο (Wojnowski, 2004).

Το CYP3A5 εντοπίζεται επίσης στο ήπαρ και το λεπτό έντερο, αλλά η ηπατική έκφραση εμφανίζει πολύ μεγαλύτερη ποικιλότητα και είναι συνήθως πολύ χαμηλότερη απ' ό,τι του CYP3A4. Σε μερικά άτομα όμως, το CYP3A5 συνιστά μέχρι και το 50% της συνολικής ποσότητας CYP3A στο ήπαρ. Επιπλέον, το CYP3A5 φαίνεται να αποτελεί την κυριότερη ισομορφή του CYP3A στους νεφρούς (Kuehl et al, 2001).

Ο λειτουργικός ρόλος των δυο άλλων μελών της οικογένειας CYP3A, των CYP3A7 και CYP3A43, δεν είναι ακόμη πλήρως γνωστός. Το CYP3A43 εκφράζεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα στο ήπαρ (Ingelman-Sundberg M., 2004). Η αμινοξική αλληλουχία του εμφανίζει ομολογία κατά 75% με τα CYP3A4 και CYP3A5 και 71% με το CYP3A7. Λόγω του χαμηλού επιπέδου έκφρασης, θεωρείται ότι η συμβολή του CYP3A43 στη μεταβολική δραστηριότητα του CYP3A είναι ελάχιστη (Steven Wong, et al, 2010).

1.11 ΦΑΡΜΑΚΟΓΕΝΕΤΙΚΗ

Οι σημαντικές αποκλίσεις που παρατηρούνται ανάμεσα στους ασθενείς ως προς την αναμενόμενη απόκρισή τους στην ίδια φαρμακευτική αγωγή αποτελούν ένα σοβαρό πρόβλημα στην κλινική πράξη. Οι αποκλίσεις αυτές εκδηλώνονται είτε ως ανεπιθύμητες ενέργειες ή ως μειωμένη φαρμακολογική αποτελεσματικότητα και αποδίδονται σε συνδυασμό περιβαλλοντικών, παθοφυσιολογικών και γενετικών παραγόντων.

Η φαρμακογενετική και πολύ περισσότερο η φαρμακογονιδιοματική συμβάλλουν στην κατανόηση των γενετικών διαφορών μεμονωμένων ατόμων και στο βαθμό που αυτές καθορίζουν την αποτελεσματικότητα και ασφάλεια στα φάρμακα για τον κάθε ασθενή.

Οι σχέσεις μεταξύ ενδοατομικών γενετικών διαφορών και του βαθμού απόκρισης στα φάρμακα αποτελεί το κύριο γνωστικό αντικείμενο της φαρμακογονιδιωματικής. Τελικός στόχος της φαρμακογονιδιωματικής αποτελεί η ανάπτυξη νέων φαρμάκων που θα ανταποκρίνεται στις ανάγκες του κάθε ασθενούς ή ομάδας ασθενών ξεχωριστά δηλαδή στην εξατομίκευση της θεραπείας (personalized medicine).

Στα άτομα στα οποία ένα από τα δύο αλληλόμορφα παρουσιάζει πολυμορφισμούς (single nucleotide polymorphisms, SNPs) η σύσταση της τελικής πρωτεΐνης ή του ενζύμου διαφέρει. Αν η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από τα αλληλόμορφα που παρουσιάζουν διαφορές τύπου SNPs αποτελεί ζωτικό ένζυμο μεταβολισμού ή πρωτεΐνη μεταφοράς φαρμάκων και το SNP οδηγεί σε αντικατάσταση αμινοξέος που επηρεάζει τη διαμόρφωση και κατά συνέπεια τη λειτουργία της, τότε η αποτελεσματικότητα και η ασφάλεια του φαρμάκου επηρεάζεται αφού επηρεάζεται ο βαθμός απορρόφησης, κατανομής, μεταβολισμού, απέκκρισης αλλά και δράσης του στους ιστούς (Steven Wong, et al, 2010).

1.11.1 Φαρμακογενετικές μελέτες σε ασθενείς με ψωρίαση

Οι περισσότερες φαρμακογενετικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε ασθενείς με ψωρίαση, έχουν συσχετίσει διάφορους πολυμορφισμούς με ανταπόκριση στη θεραπεία με βιολογικούς παράγοντες.

Έχει πραγματοποιηθεί φαρμακογενετική μελέτη συσχέτισης του πολυμορφισμού rs1801274 του γονιδίου *FcγRIIA* με την ανταπόκριση στη θεραπεία με παράγοντες αντι-TNF σε ασθενείς με ψωριασική αρθρίτιδα. Τα αποτελέσματα δεν έδειξαν καμία στατιστικά σημαντική συσχέτιση (Ramirez et al, 2010).

Παρόμοια μελέτη έχει γίνει με άλλους δύο πολυμορφισμούς, τους *FcγRIIA*-H131R και *FcγRIIA*-V158F. Ο γονότυπος για το *FcγRIIA* φάνηκε να έχει συσχέτιση, ενώ ο *FcγRIIA* δεν έδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την απόκριση στη θεραπεία (Ramirez et al, 2012).

Μια μελέτη σε ασθενείς με ψωρίαση που λάμβαναν θεραπεία με παράγοντες αντι-TNF-α έδειξε συσχέτιση του πολυμορφισμού rs1801274 του γονιδίου *FcγRIIA* και του rs396991 του γονιδίου *FcγRIIA* με την απόκριση στη θεραπεία με αντι-TNF παράγοντες (Julia et al, 2013).

Φαρμακογενετική μελέτη συσχέτισης αυτών των δυο πολυμορφισμών έχει πραγματοποιηθεί και στο εργαστήριο Γενετικής, Εξελικτικής και Συγκριτικής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (αδημοσίευτα αποτελέσματα) (Vasilopoulos et al, 2014)

Επιπλέον, σε ψωριασικούς ασθενείς μελετήθηκαν πέντε πολυμορφισμοί σε γονίδια που κωδικοποιούν τον TNF-α, τον υποδοχέα I του TNF-α (TNFRSF1A) και τον υποδοχέα II (TNFRSF1B) ως προς τη συσχέτισή τους με την ανταπόκριση σε

αναστολείς αντι-TNF-α. Τα αποτελέσματα έδειξαν συσχέτιση των γονοτύπων με την απόκριση στη θεραπεία (Vasilopoulos et al, 2012).

Μια άλλη φαρμακογενετική μελέτη συσχέτισης πολυμορφισμών των γονιδίων *ABCB1* (P-γλυκοπρωτεΐνη) και *MTHFR* με την ανταπόκριση σε θεραπεία με κυκλοσπορίνη/μεθοτρεξάτη (συστημική θεραπεία), έγινε σε ασθενείς με ψωρίαση στον ελληνικό πληθυσμό ωστόσο κανένας από τους δύο πολυμορφισμούς δεν έδειξε στατιστικά σημαντική συσχέτιση με την ανταπόκριση στη θεραπεία (Vasilopoulos et al, 2013).

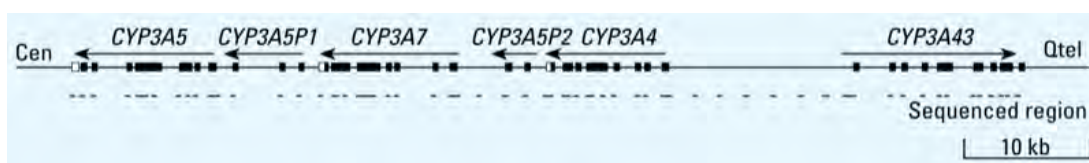
1.11.2 Πολυμορφισμοί σε ένζυμα μεταβολισμού των φαρμάκων

Το μεγαλύτερο ποσοστό του μεταβολισμού των φαρμάκων λαμβάνει χώρα στο ήπαρ και τα κύρια ένζυμα που συμμετέχουν ανήκουν στην οικογένεια του κυτοχρώματος P-450. Τα ένζυμα παρουσιάζουν διάφορες ισομορφές που διαφέρουν σε δραστηριότητα και τα επίπεδά τους ποικίλουν ανάμεσα στους διάφορους ασθενείς. Με βάση τις διαφοροποιήσεις στα ένζυμα CYP450, οι άνθρωποι διακρίνονται σε 4 μεταβολικούς τύπους:

- Η πλειοψηφία ανήκει στους **γρήγορους μεταβολιστές**, οι οποίοι αποικοδομούν τα φάρμακα σε φυσιολογικό ρυθμό και επίπεδο.
- Ένα δεύτερο μέρος του πληθυσμού ανήκει στους **ενδιάμεσους μεταβολιστές**, οι οποίοι αποικοδομούν τα φάρμακα σε πιο αργό ρυθμό. Πολλές φορές ο συνδυασμός φαρμακευτικών αγωγών μπορεί να επιβραδύνει ακόμα περισσότερο την ενζυμική δράση, προκαλώντας έντονες παρενέργειες.
- Η τρίτη κατηγορία είναι οι **αργοί μεταβολιστές**, οι οποίοι παρουσιάζουν ανεπάρκεια στην αποικοδόμηση των φαρμάκων. Το τελικό αποτέλεσμα είναι η συσσώρευση του φαρμάκου στον οργανισμό σε τοξικά επίπεδα που μπορούν ακόμα και να απειλήσουν τη ζωή του ασθενή.
- Τέλος, είναι οι **πολύ γρήγοροι μεταβολιστές**, οι οποίοι αποικοδομούν τα φάρμακα σε πολύ γρήγορο ρυθμό, με αποτέλεσμα να έχουν ελάχιστο ή και κανένα θεραπευτικό αποτέλεσμα.

Γενετική ποικιλότητα του *CYP3A*

Το σύμπλεγμα των γονιδίων *CYP3A* του ανθρώπου, στο χρωμόσωμα 7q21-q22.1, αποτελείται από τέσσερα γονίδια και δυο ψευδογονίδια: *CYP3A4*, *CYP3A5*, *CYP3A7*, *CYP3A43*, *CYP3AP1* και *CYP3AP2* που θεωρείται ότι δημιουργήθηκαν μέσω γονιδιακού διπλασιασμού (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Γονιδιωματική οργάνωση των γονιδίων και ψευδογονιδίων του γενετικού τόπου *CYP3A*. Cen= κεντρομερές, Qtel=τελομερές. Τα εξόνια για τα γονίδια και τα ψευδογονίδια παρίστανται ως τετραγώνια. Τα βέλη δείχνουν το μεταγραφικό προσανατολισμό (Xiaoping Chen et al, 2009).

Έχει παρατηρηθεί μεγάλη ποικιλότητα μεταξύ ατόμων (μέχρι και 40 φορές) στη δραστικότητα του *CYP3A*. Τα ένζυμα *CYP3A4* και *CYP3A5* είναι υπεύθυνα για το μεταβολισμό ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων καθώς και στεροειδών και αντιβιοτικών. Μεγάλος αριθμός μονονουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (SNPs) σε αυτά τα δυο γονίδια έχουν ταυτοποιηθεί και δημοσιεύει, με μερικά από αυτά να συμβάλλουν στις μεταβολές δραστικότητας των ενζύμων (<http://www.cypalleles.ki.se/>).

Γενετικοί πολυμορφισμοί στο *CYP3A4*

Σε αντίθεση με τα άλλα ένζυμα *CYP*, δεν έχει περιγραφεί κάποιο “μηδενικό” αλληλόμορφο (που να κωδικοποιεί ένζυμο με μηδενική ενζυμική δραστικότητα) για το *CYP3A4*, το πιο σημαντικό μέλος της οικογένειας *CYP3A* παρότι έχουν δημοσιευτεί πάνω από 30 SNP για το *CYP3A4*. Αυτά τα παραλλαγμένα αλληλόμορφα του *CYP3A4* έχουν πάρει το χαρακτηρισμό *1 έως *26 (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp3a4.htm>, τελευταία ανανέωση: 10 Αυγούστου 2014).

Οι πολυμορφισμοί του γονιδίου CYP3A4, η θέση τους στο γονίδιο καθώς και η ενζυμική τους δραστηριότητα, που έχουν δημοσιευτεί μέχρι σήμερα φαίνονται στον Πίνακα 1:

Πίνακας 1: Πολυμορφισμοί SNP του γονιδίου CYP3A4 (<http://www.pharmgkb.org/>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=cyp3a4>).

<u>Αλληλόμορφο</u>	<u>SNP</u>	<u>Θέση</u>	<u>Ενζυμική ενεργότητα</u>	<u>Σημειώσεις</u>
<i>CYP3A4*1A</i>	Αγρίου τύπου	7q22.1	Φυσιολογική	
<i>CYP3A4*1B</i>	A-392G	Υποκινητής	↓	Μειωμένη παραγωγή ενζύμου λόγω παρερμηνεύσιμης μετάλλαξης
<i>CYP3A4*2</i>	T15713C	Εξόνιο 7	↓	Παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη
<i>CYP3A4*3</i>	T23171C	Εξόνιο 12	↓	Παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη
<i>CYP3A4*4</i>	A13871G	–	↓	–
<i>CYP3A4*5</i>	C15702G	–	↓	–
<i>CYP3A4*6</i>	17661_176622 insA	Εξόνιο 9	↓	Κωδικόνιο λήξης
<i>CYP3A4*7</i>	G6004A	Εξόνιο 3	↔	Παρόμοια ενεργότητα με το αγρίου τύπου
<i>CYP3A4*8</i>	G13908A	Εξόνιο 5	↓	
<i>CYP3A4*9</i>	G14292A	Εξόνιο 6	↔	Παρόμοια ενεργότητα με το αγρίου τύπου
<i>CYP3A4*10</i>	G14304C	Εξόνιο 6	↔	Παρόμοια ενεργότητα με το αγρίου τύπου
<i>CYP3A4*11</i>	C21867T	Εξόνιο 11	↓	Μειωμένη έκφραση του γονιδίου
<i>CYP3A4*12</i>	C21896T	Εξόνιο 11	↓	–
<i>CYP3A4*13</i>	C22026T	Εξόνιο 11	↓	–
<i>CYP3A4*14</i>	T44C	Εξόνιο 1	–	Μη συνώνυμη μετάλλαξη στην κωδική περιοχή
<i>CYP3A4*15A</i>	G14269A	Εξόνιο 6	↓	Παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη
<i>CYP3A4*16A</i>	C15603G	Εξόνιο 7	↓	–
<i>CYP3A4*16B</i>	C15603G, G20230A	Εξόνιο 7, ιντρόνιο 10	↓	Παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη
<i>CYP3A4*17</i>	T15615C	Εξόνιο 7	↓	–
<i>CYP3A4*18A</i>	T20070C	Εξόνιο 10	↓	–

<i>CYP3A4*18B</i>	T20070C,G20230A	Εξόνιο 10, ιντρόνιο 10	–	–
<i>CYP3A4*19</i>	C23237T,G20230A	Εξόνιο 12	↓	–
<i>CYP3A4*20</i>	25889_25890 insA	–	↓	Κωδικόνιο λήξης
<i>CYP3A4*21</i>	A956G	Εξόνιο 10	–	–
<i>CYP3A4*22</i>	C15389T	Ιντρόνιο 6	↓	–
<i>CYP3A4*23</i>	C14268T	Εξόνιο 6	–	Παρερμηνεύσιμη μετάλλαξη
<i>CYP3A4*24</i>	A15649T	Εξόνιο 7	–	Συνώνυμα κωδικόνια
<i>CYP3A4*25</i>		–	–	–
<i>CYP3A4*26</i>	C17633T	–	–	Κωδικόνιο λήξης

Ο πρώτος πολυμορφισμός του *CYP3A4* που περιγράφηκε ήταν η παραλλαγή *CYP3A4-V* στον υποκινητή του γονιδίου, που αργότερα μετονομάστηκε σε *CYP3A4*1B*. Η παραλλαγή αυτή, που αφορά αντικατάσταση $A \rightarrow G$ βρίσκεται στη 5' ρυθμιστική περιοχή, 392 βάσεις ανοδικά της θέσης έναρξης της μεταγραφής, στον υποκινητή του ειδικού στοιχείου της νιφεδιπίνης (η αρχική ονομασία του γονιδίου *CYP3A4*) (Keshava et al, 2004).

Αυτή η παραλλαγή εντοπίστηκε για πρώτη φορά με βάση τη συσχέτισή της με μια βαριά μορφή καρκίνου του προστάτη (Rebbeck et al, 1998).

Η κοινή παραλλαγή ονομάστηκε *CYP3A4*1A*.

Η αλληλομορφική συχνότητα παρουσιάζει μεγάλη διακύμανση μεταξύ πληθυσμιακών ομάδων: 2-9% στους Καυκάσιους, 35-67% στους Αφροαμερικανούς, 0% στους Ταϊβανέζους, 0% στους Κινέζους (Lamba et al, 2002)

Αρχικά θεωρήθηκε ότι η παραλλαγή του υποκινητή προκαλεί μειωμένη δραστηριότητα του *CYP3A4* λόγω μειωμένης μεταγραφής του γονιδίου, αλλά διαπιστώθηκε *in vitro* ότι το αλληλόμορφο *CYP3A4*1B* προκαλεί αύξηση των επιπέδων της μεταγραφής (Amirimani et al, 2003).

Γενετικοί πολυμορφισμοί στο *CYP3A5*

Τα αλληλόμορφα του *CYP3A5* έχουν πάρει το χαρακτηρισμό *1 έως *9 (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp3a5.htm>, τελευταία ανανέωση: 28 Νοεμβρίου 2013) και φαίνονται στον Πίνακα 2:

Πίνακας 2: Πολυμορφισμοί SNP του γονιδίου CYP3A5 (<http://www.pharmgkb.org/>, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=cyp3a5>)

<u>Αλληλόμορφο</u>	<u>SNP</u>	<u>Θέση</u>	<u>Ενζυμική ενεργότητα</u>	<u>Σημειώσεις</u>
<i>CYP3A5*1A</i>	Αγρίου τύπου		↓	
<i>CYP3A5*1B</i>	G-86A		↓	
<i>CYP3A5*1C</i>	C-74T		↓	
<i>CYP3A5*1D</i>	C31611T		↓	
<i>CYP3A5*1E</i>	G17163T		↓	
<i>CYP3A5*2</i>	C27289A		↓	
<i>CYP3A5*3</i>	A6986G	Εναλλακτική συρραφή	↓	Μειωμένη έκφραση και δραστηριότητα
<i>CYP3A5*4</i>	A14665G		↓	
<i>CYP3A5*5</i>	T12952C		↓	
<i>CYP3A5*6</i>	G14690A		↓	
<i>CYP3A5*7</i>	27131_27132 insT		↓	
<i>CYP3A5*8</i>	C3699T		↓	
<i>CYP3A5*9</i>	G19386A		↓	

Πρόσφατα, ένας πολυμορφισμός στο ιντρόνιο 3 του γονιδίου *CYP3A5*, ο πολυμορφισμός 6986A→G, συσχετίστηκε με την απουσία της πρωτεΐνης *CYP3A5*. Η παραλλαγή αυτή ονομάστηκε *CYP3A5*3* και περιλαμβάνει μια ιντρονική παραλλαγή που δημιουργεί μια κρυφή θέση συναρμογής, μέσω της οποίας δημιουργείται το εξόνιο 3B από την αλληλουχία του ιντρονίου 3. Το αλληλόμορφο *CYP3A5*3* οδηγεί σε εναλλακτική συρραφή που οδηγεί σε μείωση της μεταβολικής δραστηριότητας. Αντίθετα, η παρουσία του αλληλομόρφου αγρίου τύπου (A6986-*CYP3A5*1*) οδηγεί σε υψηλή καταλυτική δράση (Adler et al, 2009). Η συχνότητα του *CYP3A5*3* διαφέρει μεταξύ των πληθυσμών: 27-5-% στους Αφροαμερικανούς, 60-7-% μεταξύ των Ασιατών και έως 85-95% στους Καυκάσιους.

1.11.3 Φαρμακογενετική των αναστολέων καλσινευρίνης

Μετά την ανακάλυψη διάφορων γενετικών πολυμορφισμών στα γονίδια *CYP3A*, η άμεση σχέση ανάμεσα στη φαρμακοκινητική των ανοσοκατασταλτικών φαρμάκων και συγκεκριμένα των αναστολέων καλσινευρίνης (κυκλοσπορίνη, tacrolimus) και το γονότυπο του ατόμου έχει εξεταστεί από πολλούς ερευνητές.

Οι περισσότερες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σε ασθενείς μετά από μεταμόσχευση.

Οι Rivory και συν. ήταν οι πρώτοι που αξιολόγησαν τη σχέση ανάμεσα στο παραλλαγμένο αλληλόμορφο CYP3A4*1B και την απαιτούμενη δόση κυκλοσπορίνης σε ασθενείς μετά από νεφρική μεταμόσχευση, μεταξύ των οποίων φάνηκε να μην υπάρχει καμία συσχέτιση (Rivory et al, 2000). Η απουσία συσχέτισης έχει επιβεβαιωθεί και από άλλες μελέτες μετά από μεταμόσχευση νεφρών (Nicolas et al, 2001, Bouamar et al, 2011).

Σε αντίθεση με τις παραπάνω έρευνες, έχει βρεθεί συσχέτιση ανάμεσα στο παραλλαγμένο αλληλόμορφο CYP3A4*1B και τη φαρμακοκινητική των αναστολέων καλσινευρίνης. Ο πολυμορφισμός CYP3A4*1B φαίνεται να αποτελεί σημαντικό παράγοντα που επηρεάζει τη φαρμακοκινητική του tacrolimus και της κυκλοσπορίνης καθώς ασθενείς με το αλληλόμορφο *1B απαιτούν, σύμφωνα με ορισμένες μελέτες, υψηλότερες δόσεις των δύο φαρμάκων για να επιτύχουν την απαραίτητη συγκέντρωση στο αίμα, σε σχέση με τους ομοζυγώτες για το αλληλόμορφο *1 (Hesselink et al, 2003, Hesselink et al, 2004, Żochowska et al, 2012, Tavira et al, 2011). Μια πιο πρόσφατη μελέτη, έρχεται σε αντίθεση με τις προηγούμενες, καθώς έδειξε ότι οι ασθενείς με το αλληλόμορφο *1B απαιτούν χαμηλότερες δόσεις tacrolimus για να επιτευχθεί η βέλτιστη συγκέντρωσή του, σε σχέση με τους ομοζυγώτες για το αλληλόμορφο *1 (Abdulkareem et al, 2013).

Η σχέση του γονοτύπου του CYP3A5 και της φαρμακοκινητικής των αναστολέων καλσινευρίνης έχει μελετηθεί πολύ. Από μελέτες φαρμακοκινητικής σε ασθενείς μετά από μεταμόσχευση νεφρού φαίνεται ότι ο προσδιορισμός του γονοτύπου του CYP3A5 είναι χρήσιμος για το σχεδιασμό της κατάλληλης ανοσοκατασταλτικής θεραπείας και τη μείωση της τοξικότητας από τη δόση του tacrolimus και της κυκλοσπορίνης (Vannaprasaht et al, 2013, Åsberg et al, 2013, Jonge et al, 2013, Zheng et al, 2013). Συγκεκριμένα, διάφορες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί έχουν δείξει ότι ασθενείς με μεταμόσχευση νεφρού οι οποίοι είναι ετερόζυγοι για το αλληλόμορφο *3 του γονιδίου CYP3A5 (*1/*3) απαιτούν 1,5-2 φορές υψηλότερη δόση ανοσοκατασταλτικού φαρμάκου για να επιτύχουν τη συγκέντρωση-στόχο, σε σύγκριση με τους ομόζυγους για το αλληλόμορφο (*3/*3) (Press et al, 2009, Yang Dai et al, 2006, Tavira et al, 2011). Μια άλλη μελέτη, έδειξε ότι ασθενείς κορεατικής καταγωγής, μετά από μεταμόσχευση ήπατος, που είχαν το παραλλαγμένο αλληλόμορφο *3 απαιτούσαν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις φαρμάκου απ' ότι οι ασθενείς με το αγρίου τύπου αλληλόμορφο *1, ώστε να έχουν το καλύτερο θεραπευτικό αποτέλεσμα (Jun et al, 2009). Τέλος, άλλες μελέτες, έδειξαν ότι δεν υπάρχει καμία συσχέτιση του αλληλομόρφου *3 του γονιδίου CYP3A5 με τη φαρμακοκινητική της κυκλοσπορίνης (Hesselink et al, 2004, Azarpira et al, 2006, Bouamar et al, 2011).

1.12 ΣΚΟΠΟΣ

Με βάση το ρόλο των γονιδίων *CYP3A4* και *CYP3A5* στο μεταβολισμό της κυκλοσπορίνης καθώς επίσης και τα αποτελέσματα πολλών μελετών που συσχετίζουν συγκεκριμένους πολυμορφισμούς τους με την απόκριση στη θεραπεία ασθενών που έχουν δεχτεί μεταμόσχευση, με ανοσοκατασταλτικά φάρμακα, σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να διερευνηθεί η πιθανή συσχέτιση των πολυμορφισμών *CYP3A4*1B* (rs2740574) και *CYP3A5*3* (rs776746) σε αυτά τα γονίδια με την ανταπόκριση των ασθενών με ψωρίαση στον ελληνικό πληθυσμό, στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Ελήφθη δείγμα περιφερικού αίματος από 63 ασθενείς με βεβαιωμένη ψωρίαση (με βάση το δείκτη PASI) από τη Δερματολογική Κλινική του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Λάρισας και τη Δερματολογική Κλινική του Νοσοκομείου Παπαγεωργίου Θεσσαλονίκης. Τα δείγματα αίματος τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια με αντιπηκτικό EDTA και αποθηκεύτηκαν στους -20°C .

Συγκεντρώθηκαν τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών, το φύλο, η ηλικία, ο τύπος ψωρίασης, οι συνυπάρχουσες νόσοι καθώς και η χορηγούμενη φαρμακευτική αγωγή. Οι ασθενείς έλαβαν κυκλοσπορίνη (3mg/kg/day) για τουλάχιστον 3 μήνες. Εκτιμήθηκε ο δείκτης PASI πριν και μετά τη θεραπεία ώστε να κατηγοριοποιηθούν οι ασθενείς σε ανταποκριθέντες ($\text{PASI} \geq 75\%$) και μη-ανταποκριθέντες ($\text{PASI} < 50\%$).

Γραπτή συναίνεση ελήφθη από όλα τα άτομα που πήραν μέρος στη μελέτη.

2.2 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΓΟΝΟΤΥΠΟΥ

Πραγματοποιήθηκε γονοτύπηση στο DNA των ασθενών για τον προσδιορισμό των γονοτύπων των αλληλομόρφων *CYP3A5*3* και *CYP3A4*1B*, με την ακόλουθη μεθοδολογία:

1. Λήψη περιφερικού αίματος από κάθε ασθενή και απομόνωση DNA από τα λευκά αιμοσφαίρια.
2. Έλεγχος ποσότητας και ακεραιότητας του γενωμικού DNA.
3. Ενίσχυση της επιθυμητής αλληλουχίας με τη χρήση αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction- PCR).
4. Έλεγχος επιτυχούς ενίσχυσης της επιθυμητής αλληλουχίας.
5. Πέψη του προϊόντος PCR με το κατάλληλο ένζυμο.
6. Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης για την ταυτοποίηση του γονοτύπου των ασθενών.

2.2.1 Απομόνωση DNA από δείγμα περιφερικού αίματος

Η απομόνωση του DNA γίνεται από τα εμπύρνηνα κύτταρα (λευκά αιμοσφαίρια) περιφερικού αίματος ασθενών με ψωρίαση. Το πρώτο βήμα για την απομόνωση του DNA είναι η διάρρηξη των μεμβρανών και λύση των κυττάρων με κατάλληλο διάλυμα λύσης και χρήση απορρυπαντικών (SDS) που διαλυτοποιούν τις μεμβρανικές πρωτεΐνες και τα λιπίδια. Ακολουθεί επώαση με πρωτεϊνάση K, που διασπά τις γλυκοπρωτεΐνες και τις ιστόνες και αδρανοποιεί τις νουκλεάσες οι οποίες καταστρέφουν τα μόρια DNA. Τα υπολείμματα κυττάρων, μεμβρανών και οι

πρωτεΐνες απομακρύνονται με τη χρήση οργανικών διαλυτών (φαινόλη, χλωροφόρμιο). Η φαινόλη οδηγεί στο διαχωρισμό των φάσεων, μιας υδατικής στην οποία βρίσκεται το DNA και μιας οργανικής φάσης στην οποία βρίσκεται η φαινόλη με τις πρωτεΐνες. Το χλωροφόρμιο απομακρύνει τα υπολείμματα φαινόλης και συμβάλλει στην εκχύλιση των λιπιδίων. Τέλος, το DNA κατακρημνίζεται από ισοπροπανόλη και στη συνέχεια από αιθανόλη 70% και επαναδιαλύεται σε ddH₂O.

Διαλύματα:

- **20X SSC ρυθμιστικό διάλυμα** (3M sodium chloride, 0.3M sodium citrate, pH=7.0): Για την παρασκευή του διαλύματος 1X SSC γίνεται αραίωση του πυκνού διαλύματος 20X SSC.
- **3M Οξικό Νάτριο (CH₃COONa)**: 40,81 gr οξικού νατρίου διαλύονται σε ddH₂O. Ρύθμιση του pH στο 5,2 με προσθήκη CH₃COOH και ρύθμιση του όγκου με ddH₂O στα 100ml. Για την παρασκευή του διαλύματος οξικού νατρίου 0,2M γίνεται αραίωση του πυκνού διαλύματος 3M.
- **10% SDS (Sodium dodecyl sulfate)**: 10 gr SDS σε ddH₂O και ρύθμιση του όγκου με ddH₂O στα 100 ml. Για την Παρασκευή του διαλύματος 5% SDS γίνεται αραίωση του διαλύματος 10% SDS.

Πρωτόκολλο απομόνωσης:

1. Σε αποστειρωμένο φιαλίδιο χωρητικότητας 1,5ml τοποθετήθηκαν 500μl αίματος.
2. Προστέθηκε 1ml ρυθμιστικού διαλύματος SSC 1X και ακολούθησε ανάδευση του μείγματος.
3. Φυγοκέντρηση για 3min στις 13.000 rpm και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
4. Επανάληψη των βημάτων 2 και 3.
5. Στο ίζημα προστίθενται 600μl CH₃COONa 0,2M, 50μl SDS 5% και 10μl πρωτεϊνάση K (10mg/ml). Ακολουθεί επαναδιάλυση του ιζήματος με vortex.
6. Επώαση για 1h στους 55°C.
7. Προστίθενται 500μl φαινόλη και 500μl χλωροφόρμιο. Ακολουθεί vortex για 5 sec.
8. Φυγοκέντρηση για 10min στις 13.000 rpm στους 4°C.
9. Η υδατική φάση μεταφέρεται σε νέο φιαλίδιο 1,5ml και ακολουθεί προσθήκη 1ml χλωροφόρμιο και vortex.
10. Φυγοκέντρηση για 5min στις 13.000 rpm στους 4°C.

11. Σε νέο tube 1,5ml μεταφέρεται η υδατική φάση και προστίθεται 1ml παγωμένης ισοπροπανόλης. Ακολουθεί ανάδευση και επώαση στους -20°C για 20min.
12. Φυγοκέντρωση για 20min στις 13.000 rpm στους 4°C και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
13. Προσθήκη παγωμένης αιθανόλης 70% και ανάδευση.
14. Φυγοκέντρωση για 5min στις 13.000 rpm στους 4°C .
15. Απομακρύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει για 1h στους 37°C .
16. Το ίζημα επαναδιαλύεται με την προσθήκη 100μl ddH₂O και επώαση για 1h στους 55°C .
17. Αποθήκευση στους -20°C .

2.2.2 Έλεγχος της αποτελεσματικότητας της απομόνωσης του DNA

Ο έλεγχος της επιτυχούς απομόνωσης και ακεραιότητας του DNA έγινε με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης.

Ηλεκτροφόρηση- Αρχή της μεθόδου

Η ηλεκτροφόρηση στηρίζεται στην αρχή ότι το DNA είναι αρνητικά φορτισμένο και κατά την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου μετακινείται από το θετικό στον αρνητικό πόλο. Η ταχύτητα μετακίνησης του DNA στο πήκτωμα αγαρόζης εξαρτάται από το μοριακό μέγεθος, τη συγκέντρωση της αγαρόζης, τη διαμόρφωση του DNA καθώς και τη διαφορά τάσης του πεδίου.

Έτσι, μόρια μεγαλύτερου μεγέθους μετακινούνται πιο αργά από τα μόρια μικρότερου μεγέθους. Επίσης, για μελέτη μορίων μικρού μεγέθους, απαιτείται πυκνό πήκτωμα αγαρόζης και το αντίστροφο. Για τον προσδιορισμό του μεγέθους των υπό μελέτη μορίων, χρησιμοποιείται πάντα κάποιος δείκτης μεγέθους.

Προκειμένου τα τμήματα DNA να γίνουν ορατά στο υπεριώδες φως, χρησιμοποιείται το βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr). Η ουσία αυτή έχει την ικανότητα να δεσμεύεται στο DNA και να διεγείρεται από την υπεριώδη ακτινοβολία με αποτέλεσμα οι ζώνες του DNA να είναι ορατές.

Διαλύματα:

- **50X TAE:** 121gr Trisbase 2M αναμειγνύονται με 28,5ml οξικό οξύ και 50ml EDTA 0.5M και προστίθεται ddH₂O μέχρι τα 500ml. Για την Παρασκευή του διαλύματος 1X TAE γίνεται αραίωση του 50X TAE.
- **0.5M EDTA (pH:8.0):** Σε 400ml ddH₂O προστίθενται 93,1gr Na₂EDTA. Ακολουθεί ρύθμιση του pH με προσθήκη NaOH μέχρι τα 500ml και pH=8.0. Αποθηκεύεται στους 4°C.
- **Διάλυμα φόρτωσης (6X):** 5ml glycerol, 1ml bromophenol blue και 0,5ml TBE 20X προστίθενται σε 3,5ml ddH₂O. Αποθηκεύεται στους 4°C ή 20°C.
- **20X TBE:** 121gr Tris-base, 71,7gr Boric Acid και 80ml 0,5M EDTA διαλύονται σε ddH₂O μέχρι ο τελικός όγκος να είναι 500 ml.
- **EtBr(10mg/ml):** 100mg EtBr σε 10ml ddH₂O.

Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης

Υπολογίζεται η ποσότητα της αγαρόζης με βάση την επιθυμητή τελική συγκέντρωση αγαρόζης του πηκτώματος. Η τελική συγκέντρωση αγαρόζης είναι 1% για ηλεκτροφόρηση γενωμικού DNA και 1,5- 2,0% για ανάλυση μικρών προϊόντων PCR (100-300bp) ενώ ο όγκος του διαλύματος εξαρτάται από τις διαστάσεις της μήτρας που χρησιμοποιείται για τη στερεοποίηση του πηκτώματος (χρησιμοποιήθηκαν 50ml).

Η κατάλληλη ποσότητα αγαρόζης διαλύεται σε διάλυμα TAE συγκέντρωσης 1X με θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι βρασμού. Στη συνέχεια προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο (1mg/ml) 1μl/10ml διαλύματος. Ακολουθεί ανάδευση και τοποθέτηση του διαλύματος στην κατάλληλη μήτρα. Το πήκτωμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι να στερεοποιηθεί.

Στη συνέχεια το πήκτωμα τοποθετείται σε διάλυμα TAE συγκέντρωσης 1X και επιλέγονται τα μl του απομονωμένου DNA [μαζί με αντίστοιχα μl χρωστικής loading buffer (6X)] για να τοποθετηθούν στα πηγαδάκια. Η ποσότητα DNA επιλέγεται με βάση την συγκέντρωση του δείγματος και την ποσότητα που απαιτείται ώστε να είναι διακριτή η ζώνη μετά την ηλεκτροφόρηση. Έτσι ηλεκτροφορήθηκαν τουλάχιστον 100 ng. Εφαρμόζεται τάση 100 Volt. Τέλος, γίνεται έλεγχος του πηκτώματος σε λάμπα υπεριώδους ακτινοβολίας και φωτογράφιση

2.2.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Αρχή της μεθόδου

Πρόκειται για μεθοδολογία που περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1985 και επιτρέπει τον *in vitro* επιλεκτικό πολλαπλασιασμό συγκεκριμένου τμήματος DNA από το γενωμικό DNA. Η αντίδραση είναι εκθετική αφού σε κάθε κύκλο η ποσότητα του DNA διπλασιάζεται. Το αρχικό μόριο DNA και τα προϊόντα των επόμενων κύκλων χρησιμοποιούνται σαν υπόστρωμα σε κάθε επόμενο κύκλο.

Η PCR αποτελεί μια κυκλική επανάληψη τριών βημάτων:

1. Θερμική αποδιάταξη του DNA-στόχου (denaturation): Πραγματοποιείται σε υψηλή θερμοκρασία (92-96°C για 30-60 sec) ώστε να σπάσουν οι δεσμοί υδρογόνου που συγκρατούν τις δύο έλικες του DNA.
2. Υβριδοποίηση των εκκινητών (primer annealing): Πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 40-70°C για 20-60 δευτερόλεπτα, με αποτέλεσμα οι εκκινητές να υβριδοποιούνται με τις αποδιατεταγμένες αλυσίδες του DNA.
3. Σύνθεση DNA με επιμήκυνση των εκκινητών (primer extension): Πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 70-72°C για 60-180 sec. Ο χρόνος που απαιτείται για την επέκταση των εκκινητών εξαρτάται από το μήκος της αλληλουχίας που πρόκειται να ενισχυθεί (ο ρυθμός επέκτασης από την πολυμεράση είναι ~50-100 νουκλεοτίδια/sec. Η σύνθεση των δύο νέων μορίων γίνεται με μια θερμοανθεκτική πολυμεράση, η οποία προσθέτει δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) στους εκκινητές.

Οι παραπάνω αντιδράσεις επαναλαμβάνονται συνήθως 30-50 φορές (κύκλοι). Επειδή τα προϊόντα ενός κύκλου χρησιμοποιούνται ως υπόστρωμα στον επόμενο, ο αριθμός των τμημάτων DNA διπλασιάζεται με το τέλος του κάθε κύκλου. Έτσι, μετά το τέλος της συνολικής ενίσχυσης, το αρχικό μόριο DNA έχει αυξηθεί λογαριθμικά σύμφωνα με τον τύπο $N = 2^t (N_0)$, όπου N: ο τελικός αριθμός αντιγράφων της αλληλουχίας-στόχου, t: ο αριθμός των κύκλων και N_0 : ο αριθμός των αντιγράφων της αλληλουχίας-στόχου.

Για την πραγματοποίηση της PCR απαιτούνται:

1. DNA-στόχος: Είναι απαραίτητη η γνώση της αλληλουχίας του DNA που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε, τουλάχιστον των άκρων της ώστε να μπορούν να σχεδιαστούν οι εκκινητές. Συνήθως σε μια αντίδραση προστίθενται 100- 500ng γονιδιωματικού DNA.

2. *Εκκινητές (primers)*: Είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια μεγέθους 15-30 βάσεων. Η αλληλουχία τους είναι συμπληρωματική με τη μία από τις δύο αλυσίδες DNA. Τα ζεύγη εκκινητών ορίζουν το τμήμα του DNA το οποίο θα πολλαπλασιαστεί. Η αλληλουχία τους πρέπει να είναι μοναδική, ώστε να επιτευχθεί 100% ειδικότητα ως προς το αποτέλεσμα της ενίσχυσης.
3. *Ισομοριακό μείγμα των τεσσάρων τριφωσφορικών δεοξυνουκλεοτιδίων (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dTTP)*: Είναι τα δομικά μονομερή για το σχηματισμό των νέων αλυσίδων.
4. *Θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση*: Πρόκειται για ένα ένζυμο που συνδυάζει την ικανότητα αντιγραφής του DNA με την αντοχή σε υψηλές θερμοκρασίες. Αυτές οι ιδιότητες της επιτρέπουν να παραμένει ενεργή στο στάδιο της αποδιάταξης του DNA κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Η πολυμεράση που χρησιμοποιείται συνήθως είναι η Taq πολυμεράση, από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus*.
5. *Ιόντα μαγνησίου (Mg^{2+})*: Το μαγνήσιο επιδρά στην ειδικότητα και ευαισθησία της PCR, καθώς αποτελεί συνένζυμο της DNA πολυμεράσης και σταθεροποιεί το δίκλωνο DNA. Η συγκέντρωση των ιόντων μαγνησίου καθορίζει την ενεργότητα της πολυμεράσης. Χαμηλή συγκέντρωση ιόντων μαγνησίου έχει ως αποτέλεσμα μειωμένη απόδοση προϊόντος, ενώ υψηλή συγκέντρωση προκαλεί την παραγωγή παραπροϊόντων και άρα χαμηλή ειδικότητα.
6. *Ρυθμιστικό διάλυμα*: Τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιούνται, είναι υδατικά διαλύματα αλάτων και χημικών ουσιών που αυξάνουν την ικανότητα αποδιάταξης του DNA και διευκολύνουν την υβριδοποίηση των εκκινητών και τη δράση της πολυμεράσης. Επίσης, τα ρυθμιστικά διαλύματα διατηρούν σταθερό το pH του μείγματος της αντίδρασης.

Ενίσχυση της επιθυμητής αλληλουχίας

Στην παρούσα μελέτη, η τεχνική της PCR, εφαρμόστηκε για την ενίσχυση δύο τμημάτων των γενετικών τόπων CYP3A5 και CYP3A4 που περιλαμβάνουν τους πολυμορφισμούς rs776746 και rs2740574 αντίστοιχα

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των παραπάνω τμημάτων, έχουν περιγραφεί από τους Rahsaz et al (2012) και Drögemöller et al (2013) αντίστοιχα και παρουσιάζονται στον Πίνακα 3. Τα υπογραμμισμένα νουκλεοτίδια είναι αυτά που λόγω ατελούς συμπληρωματικότητας δημιουργούν μια θέση περιορισμού στο προϊόν της αντίδρασης.

Πίνακας 3: Αλληλουχίες των ζευγών εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν κατά την αντίδραση της PCR

Πολυμορφισμός	Εμπρόσθιος εκκινητής	Ανάστροφος εκκινητής
CYP3A5*3	5'-ATG-GAG-AGT-GGC-ATA-GGA-GAT-A-3'	5'-TGT-GGT-CCA-AAC-GAA-GAA-ATA-3'
CYP3A4*1B	5'-GGA-CAG-CCA-TAG-AGA-CAA-GGG-GA-3'	5'-GGC-TAT-GTG-CAT-GGA-GCT-TT-3'

Η PCR

Η προετοιμασία του μίγματος για την PCR γίνεται σε πάγο και όλα τα υλικά που χρησιμοποιούνται είναι αποστειρωμένα. Ο χώρος προετοιμασίας θα πρέπει να είναι καθαρός για ελαχιστοποίηση των μολύνσεων και όλες οι εργασίες γίνονται με γάντια.

Ο τελικός όγκος των αντιδράσεων και για τους δύο πολυμορφισμούς είναι 25μl.

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του μίγματος της PCR και οι συνθήκες στις οποίες πραγματοποιήθηκαν οι αντιδράσεις παρουσιάζονται στους Πίνακες 4 και 5.

Πίνακας 4: Ποσότητες αντιδραστηρίων σε κάθε PCR και για τους δύο πολυμορφισμούς.

<u>Συστατικά PCR</u>	<u>Ποσότητες (μl)</u>
Ρυθμιστικό διάλυμα 10X +1.5mM Mg ²⁺	2.5μl
dNTPs (10mM)	1 μl
Εμπρόσθιος εκκινητής (50pmol/μl)	0.3 μl
Ανάστροφος εκκινητής (50pmol/μl)	0.3 μl
MgCl ₂ (25mM)	0.5 μl
Taq DNA πολυμεράση (5U/μl)	0.25 μl
ddH ₂ O	20.15 μl
DNA μήτρα	1 μl (100-500ng)

Πίνακας 5: Οι συνθήκες της PCR

<u>Στάδια</u>	<u>CYP3A5*3</u>		<u>CYP3A4*1B</u>	
	Θερμοκρασία	Χρόνος	Θερμοκρασία	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	94°C	10min	94°C	3min
Αποδιάταξη	94°C	30sec	94°C	15sec
Υβριδοποίηση	57°C	45sec	58°C	15sec
Επέκταση	72°C	30sec	72°C	30sec
Τελική επέκταση	72°C	10min	72°C	5min

Για τον πολυμορφισμό του γονιδίου *CYP3A5* τα στάδια της αποδιάταξης, υβριδοποίησης και επέκτασης επαναλήφθηκαν 40 φορές, ενώ για τον πολυμορφισμό του γονιδίου *CYP3A4* 30 φορές.

Ανίχνευση προϊόντων PCR

Η ανίχνευση των προϊόντων PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση τους σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% όπως περιγράφηκε στην παράγραφο: Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης.

2.2.4 Γονοτύπηση

Για τους πολυμορφισμούς *CYP3A5*3* και *CYP3A4*1B* χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος των πολυμορφισμών μεγέθους περιοριστικών τμημάτων (**R**estriction **F**ragment **L**ength **P**olymorphism-RFLP).

Κατά τη μέθοδο αυτή ανιχνεύονται πολυμορφισμοί SNPs. Χρησιμοποιούνται ειδικά ένζυμα, οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες (restriction enzymes), οι οποίες προέρχονται από διάφορα βακτήρια και έχουν την ιδιότητα να αναγνωρίζουν και να πέπτουν τις διπλές έλικες του DNA σε θέσεις οι οποίες είναι μοναδικές για κάθε ένζυμο (θέσεις περιορισμού). Τα ένζυμα αυτά συμβολίζονται με τρία γράμματα που αναφέρονται στο γένος, το είδος και το στέλεχος του οργανισμού από τον οποίο προέρχονται και ακολουθεί λατινική αρίθμηση ανάλογα με τη σειρά ταυτοποίησής τους. Οι κατάλληλες συνθήκες για τη βέλτιστη δράση των ενζύμων περιορισμού ποικίλουν όσον αφορά τη θερμοκρασία και τη σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος επώασης. Τα ένζυμα περιορισμού είναι θερμοευαίσθητα και διατηρούνται στους -20°C.

➤ Πολυμορφισμός *CYP3A5*3*

Χρησιμοποιείται η περιοριστική ενδονουκλεάση *SspI* (*Sphaerotilus species*), η οποία αναγνωρίζει και πέπτει το σπάνιο αλληλόμορφο (*CYP3A5*1*-A6986) και πιο συγκεκριμένα την αλληλουχία:



Ο τελικός όγκος κάθε αντίδρασης είναι 10μl και περιλαμβάνει:

- 1 μl ρυθμιστικού διαλύματος 10X
- 0,5μl περιοριστικής ενδονουκλεάσης *SspI*
- 3,5μl ddH₂O
- 5 μl προϊόν (50-100ng DNA)

Το διάλυμα επωάζεται ολονύκτια στους 37°C.

Το τελικό προϊόν ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης 3%.

Η περιοριστική ενδονουκλεάση *SspI* έχει μία θέση αναγνώρισης με αποτέλεσμα το προϊόν της πέψης μετά την PCR να δίνει τα εξής τμήματα:

- Ασθενείς ομόζυγοι για το συχνό πολυμορφισμό (*CYP3A5*3/*3*) μήκη 130bp.
- Ασθενείς ομόζυγοι για το γενετικό πολυμορφισμό (*CYP3A5*1/*1*) μήκη 107 bp και 23bp.
- Ασθενείς ετερόζυγοι για το γενετικό πολυμορφισμό (*CYP3A5*3/*1*) μήκη 130, 107 και 23bp.

➤ Πολυμορφισμός *CYP3A4*1B*

Χρησιμοποιείται η περιοριστική ενδονουκλεάση *MboII* (*Moraxella bovis*), η οποία αναγνωρίζει και πέπτει το συχνό αλληλόμορφο (*CYP3A4*1*-A392) και πιο συγκεκριμένα την αλληλουχία:



Ο τελικός όγκος κάθε αντίδρασης είναι 10μl και περιλαμβάνει:

- 1 μl ρυθμιστικού διαλύματος 10X
- 0,5μl l περιοριστικής ενδονουκλεάσης *MboII*
- 3,5μl ddH₂O
- 5 μl προϊόν PCR (50-100ng)

Το διάλυμα επωάζεται ολονύκτια στους 37°C. Το τελικό προϊόν ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης 6%.

Πήκτωμα πολυακρυλαμίδης-ουρίας

Η ηλεκτροφόρηση σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμίδης-ουρίας χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των μορίων βάσει μεγέθους, είναι αποδιατακτικό άρα καταργούνται οι δευτεροταγείς δομές. Τμήματα με μήκος 2-500 bp και διαφορές στο μήκος ακόμα και ενός μόνο νουκλεοτιδίου, μπορούν να διαχωριστούν χρησιμοποιώντας αυτή τη μέθοδο. Η μετακίνηση του δείγματος εξαρτάται από τη συγκέντρωση ακρυλαμίδης που έχει επιλεγεί. Μεγαλύτερη συγκέντρωση πολυακρυλαμίδης διαχωρίζει τμήματα μικρότερου μοριακού βάρους.

Η πηκτή πολυακρυλαμίδης σχηματίζεται από τον πολυμερισμό της ακρυλαμίδης $\text{CH}_2=\text{CHCONH}_2$ και της N,N-μεθυλεν-bis-ακρυλαμίδης. Η ακρυλαμίδα πολυμερίζεται σε μακριές αλυσίδες που ενώνονται με τη N,N-μεθυλεν-bis-ακρυλαμίδα. Ο πολυμερισμός γίνεται με τη χρήση ειδικών καταλυτών [TEMED (N,N' τετραμεθυλοαιθυλενοδιαμίνη), APS (υπερθειικό αμμώνιο)].

Διαλύματα:

- **Διάλυμα πολυακρυλαμίδης 30%:** 29gr ακρυλαμίδης και 1gr bis-ακρυλαμίδα διαλύονται σε 60ml ddH₂O και στη συνέχεια προστίθεται ddH₂O μέχρι τα 100ml. Αποθηκεύεται στους 4°C.
- **20X TBE:** 121gr Tris-base, 71,7gr Boric Acid και 80ml 0,5M EDTA διαλύονται σε ddH₂O μέχρι ο τελικός όγκος να είναι 500 ml.

Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδης 6%

Συναρμολογείται η συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία αποτελείται από ένα ζεύγος γυάλινων πλακών που χωρίζονται από ένα ζεύγος ισοπαχών (1.5-2.0mm) spacers.

Για την παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης 6%, όγκου 62,5ml ακολουθείται η εξής διαδικασία:

Σε ένα ποτήρι ζέσεως αναμιγνύονται:

- 6gr ουρίας
- 12,5ml διάλυμα ακρυλαμίδης 30%
- 6,25ml TBE 10X
- 50ml ddH₂O

Ακολουθεί διήθηση και προσθήκη ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 62,5ml. Το διάλυμα μεταφέρεται σε κωνική φιάλη και στη συνέχεια προστίθενται 62,5μl TEMED και 375μl APS 20%. Το διάλυμα ρίχνεται ανάμεσα στις γυάλινες πλάκες και στη κορυφή

τοποθετούνται τα χτενάκια. Ο πολυμερισμός χρειάζεται περίπου 30 min έως ότου ολοκληρωθεί. Στη συνέχεια αφαιρούνται τα χτενάκια και οι γυάλινες πλάκες τοποθετούνται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης στη οποία προστίθεται TBE 1X. Τα προϊόντα της πέψης και ο μάρτυρας μεγέθους φορτώνονται στα πηγαδάκια. Εφαρμόζεται ηλεκτρική τάση 230V για περίπου 2-2,5 h. Ακολουθεί έλεγχος του προτύπου μετά από χρώση της πηκτής ακρυλαμίδης.

Χρώση με νιτρικό άργυρο:

Η εμφάνιση των ζωνών οφείλεται στην αναγωγή της ιονικής στη μεταλλική μορφή του αργύρου μέσω της φορμαλδεΰδης σε αλκαλικό pH. Η διαδικασία χρωματισμού της πηκτής είναι η παρακάτω:

- 2 πλύσεις (200ml η κάθε μία) με οξικό οξύ (CH_3COOH) των 3 min η καθεμία. Το διάλυμα οξικού οξέος αποτελείται από 0,5ml CH_3COOH / 400ml H_2O .
- 1 πλύση των 10 min με 200ml νιτρικό άργυρο (AgNO_3) (1gr νιτρικό άργυρο/L H_2O).
- 2 ξεπλύματα με H_2O .
- 1 πλύση με διάλυμα:
 - 3gr NaOH
 - Βοροϋδρίδιο του νατρίου
 - 1ml φορμαλδεΰδη
 - 200ml H_2O
- Ξέπλυμα με νερό για 1 min.

Η περιοριστική ενδονουκλεάση *MboII* έχει δύο θέσεις αναγνώρισης με αποτέλεσμα το προϊόν της πέψης μετά την PCR να δίνει τα εξής τμήματα:

- Ασθενείς ομόζυγοι για το συχνό πολυμορφισμό ($\text{CYP3A4}^*1/^*1$) μήκη 189, 135 και 26bp.
- Ασθενείς ομόζυγοι για το γενετικό πολυμορφισμό ($\text{CYP3A4}^*1\text{B}/^*1\text{B}$) μήκη 215 και 135bp.
- Ασθενείς ετερόζυγοι για το γενετικό πολυμορφισμό ($\text{CYP3A4}^*1\text{B}/^*1$) μήκη 215, 189, 135 και 26bp.

2.2.5 Αλληλούχηση (sequencing)

Για τον πολυμορφισμό CYP3A4*1B χρησιμοποιήθηκε επιπλέον η μέθοδος της αλληλούχησης.

Το ενισχυμένο με PCR τμήμα DNA καθαρίστηκε με το εμπορικό σύστημα PureLink® PCR Purification Kit της εταιρείας Life technologies.

Στη συνέχεια τα δείγματα στέλνονται για αλληλούχηση, στην εταιρία MacroGen, η οποία γίνεται με τη χρήση του ενός εκκινητή. Επιλέχθηκε ο ανάστροφος εκκινητής καθώς βρίσκεται πιο μακριά από τον πολυμορφισμό που μελετάται (5'-GGC-TAT-GTG-CAT-GGA-GCT-TT-3'). Η απεικόνιση και η ανάλυση των αποτελεσμάτων της αλληλούχησης έγινε με το πρόγραμμα Bioedit.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΣΘΕΝΩΝ

Τα κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ψωρίαση που μελετήθηκαν για τους πολυμορφισμούς rs776746 και rs2740574 και η μεταβολή του PASI μετά από 3 μήνες θεραπείας με κυκλοσπορίνη φαίνονται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6: Κλινικά χαρακτηριστικά των ασθενών με ψωρίαση (n=63)

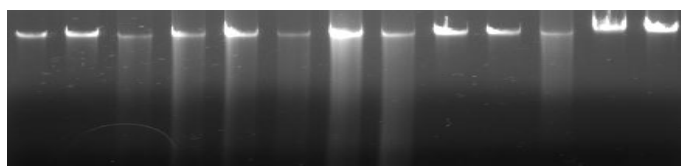
<u>Μεταβλητή</u>	<u>Τιμή</u>
Ηλικία σε έτη, μέση τιμή \pm SD*	45.58 \pm 13.42
Φύλο Α/Θ	30/33
Διάρκεια ασθένειας σε έτη, μέση τιμή \pm SD*	2.1 \pm 1.2
Ηλικία εμφάνισης σε έτη, μέση τιμή \pm SD*	34.6 \pm 11.7
Συν-νοσηρότητα, ποσοστό	20/63 (31%)
Αρχικό PASI, μέση τιμή \pm SD*	12.83 \pm 5.9
PASI στους 3 μήνες, μέση τιμή \pm SD*	3.58 \pm 3.90
Ανταποκριθέντες (PASI \geq 75%), ποσοστό	40 (63%)
Μη ανταποκριθέντες (PASI<50%), ποσοστό	23 (27%)

*Σταθερά απόκλισης (standard deviation)

Ο συνολικός αριθμός των ασθενών που μελετήθηκαν για τον πολυμορφισμό rs776746 ήταν 63 (n=63). Από τα άτομα που συμμετείχαν, οι 30 ήταν άντρες και οι 33 γυναίκες, επιβεβαιώνοντας την εμφάνιση της νόσου και στα δύο φύλα με την ίδια συχνότητα. Η μέση ηλικία των ασθενών ήταν τα 45,58 έτη, η μέση ηλικία εμφάνισης της νόσου ήταν τα 34,6 έτη και η μέση διάρκειά της τα 2,1 έτη. Οι 20 ασθενείς εμφάνιζαν συν-νοσηρότητα. Ο δείκτης PASI των ασθενών πριν από τη λήψη της θεραπείας με κυκλοσπορίνη υπολογίστηκε κατά μέσο όρο στο 12,83, ενώ μετά τη λήψη στο 3,58. Από τους ασθενείς ανταπόκριση είχαν οι 40 (63%), ενώ 23 (27%) δεν ανταποκρίθηκαν στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη.

3.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ DNA ΑΠΟ ΚΥΤΤΑΡΑ ΠΕΡΙΦΕΡΙΚΟΥ ΑΙΜΑΤΟΣ

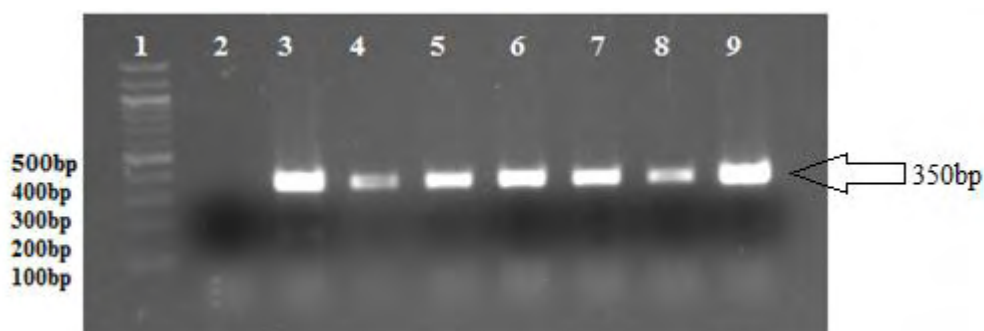
Πραγματοποιήθηκε απομόνωση γενωμικού DNA από τους ασθενείς από κύτταρα του περιφερικού αίματος. Ο έλεγχος της ποιότητας του γενωμικού DNA έγινε με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1%. Το γενωμικό DNA που εξήχθη ήταν ικανοποιητικής συγκέντρωσης και ποιότητας (Εικόνα 9).



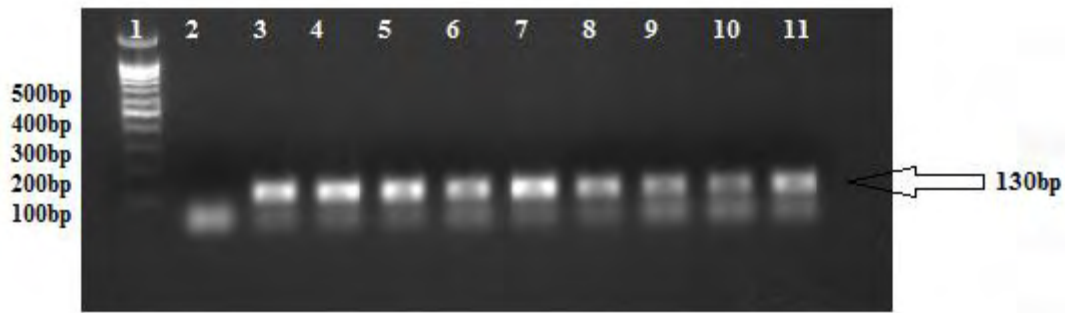
Εικόνα 9: Ενδεικτικός έλεγχος αποτελέσματος απομόνωσης γενωμικού DNA σε πήκτωμα αγαρόζης 1%.

3.3 ΑΛΥΣΙΑΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Τα τμήματα των γονιδίων *CYP3A4* και *CYP3A5* που περιέχουν τους πολυμορφισμούς rs2740574 και rs776746 αντίστοιχα, ενισχύθηκαν με PCR. Η επιτυχία της ενίσχυσης ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 1,5%. Στις Εικόνες 10 και 11 απεικονίζονται τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης των προϊόντων της PCR.



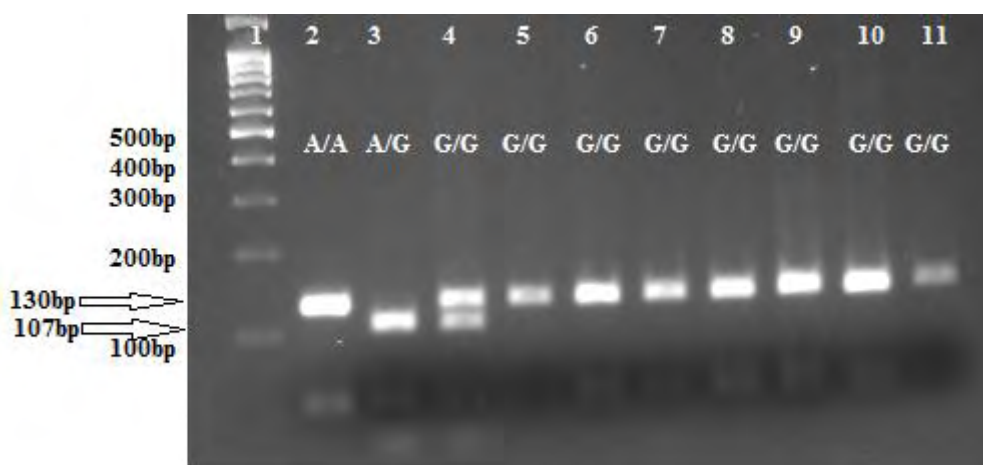
Εικόνα 10: Έλεγχος του προϊόντος της PCR τμήματος του γονιδίου *CYP3A4* σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%. Το προϊόν της PCR έχει μήκος 350bp. Στο δείγμα 1 φαίνεται ο δείκτης μοριακού βάρους, στο δείγμα 2 ο αρνητικός μάρτυρας, ενώ στα υπόλοιπα τα προϊόντα PCR.



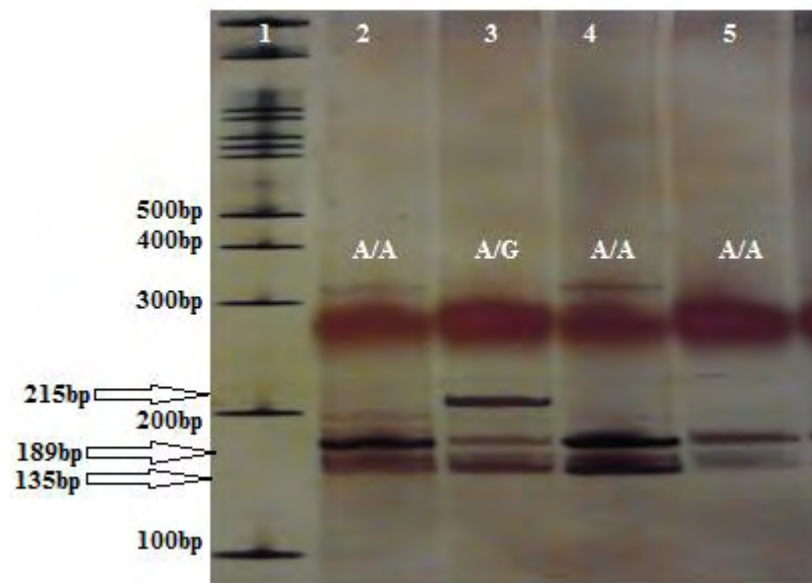
Εικόνα 11: Έλεγχος του προϊόντος της PCR του γονιδίου *CYP3A5* σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5%. Το προϊόν της PCR έχει μήκος 130bp. Στο δείγμα 1 φαίνεται ο δείκτης μοριακού βάρους, στο δείγμα 2 ο αρνητικός μάρτυρας, ενώ στα υπόλοιπα τα προϊόντα PCR.

3.4 ΓΟΝΟΤΥΠΗΣΗ-ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ

Τα προϊόντα της PCR υποβλήθηκαν σε πέψη με περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε έλεγχος με ηλεκτροφόρηση σε πηκτώματα αγαρόζης και πολυακρυλαμίδης. Στις Εικόνες 12 και 13 απεικονίζονται τα αποτελέσματα.

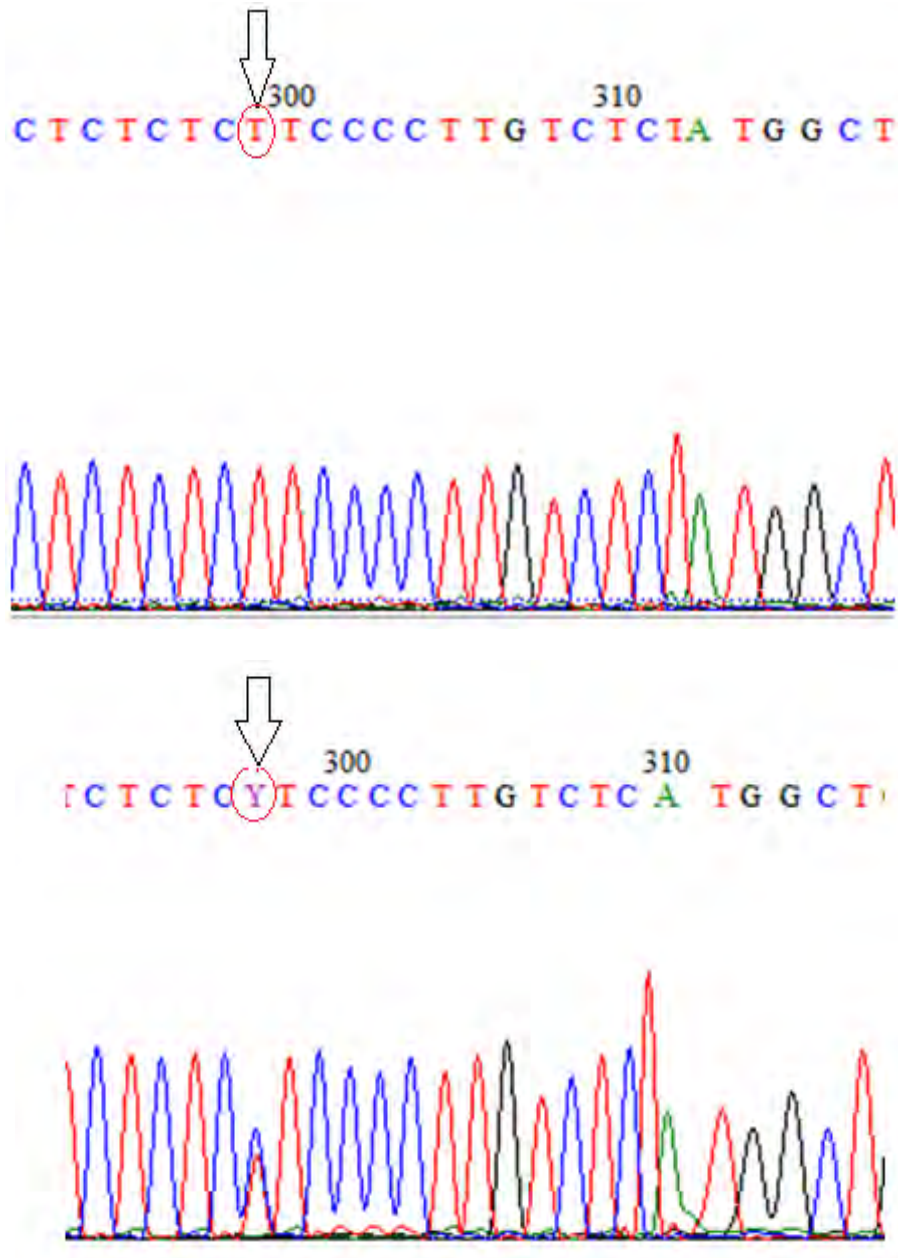


Εικόνα 12: Ανάλυση PCR-RFLP για τον πολυμορφισμό rs776746. Στο δείγμα 1 φαίνεται ο δείκτης μοριακού βάρους, στο δείγμα 2 το άπεπτο προϊόν της PCR μήκους 130bp, στο δείγμα 3 άτομο ομόζυγο για το γενετικό πολυμορφισμό (*CYP3A5**1/*1), στο δείγμα 4 άτομο ετερόζυγο για το γενετικό πολυμορφισμό (*CYP3A5**3/*1) και στα υπόλοιπα άτομα ομόζυγα για το συχνό αλληλόμορφο (*CYP3A5**3/*3).



Εικόνα 13: Ανάλυση PCR-RFLP για τον πολυμορφισμό rs2740574. Στο δείγμα 1 φαίνεται ο δείκτης μοριακού βάρους στα δείγματα 2, 4 και 5 άτομα ομόζυγα για το γενετικό πολυμορφισμό (CYP3A4*1B/*1B) και στο δείγμα 3 άτομο ετερόζυγο για το γενετικό πολυμορφισμό (CYP3A4*1B/*1).

Τα προϊόντα της PCR του πολυμορφισμού του γονιδίου *CYP3A4* στάλθηκαν για αλληλούχηση για να ελεγχθούν οι γονότυποι που εξήχθησαν μετά την ανάλυση RFLP. Ενδεικτικό αποτέλεσμα φαίνεται στην Εικόνα 14 με τη μορφή χρωματογραφήματος.



Εικόνα 14: Χρωματογραφήματα αλληλούχησης για την ανάλυση του πολυμορφισμού *CYP3A4*1B*. Τα βέλη υποδεικνύουν τον πολυμορφισμό. Το πρώτο χρωματογράφημα αντιστοιχεί σε ομοζυγωτία για το αλληλόμορφο A (A/A) και το δεύτερο σε ετεροζυγωτία (A/G).

Στον Πίνακα 7 φαίνονται τα αποτελέσματα γονοτύπησης και για τους δύο πολυμορφισμούς και η κωδική ονομασία κάθε ασθενή.

Πίνακας 7: Οι γονότυποι των ψωριασικών ασθενών που έλαβαν θεραπεία με κυκλοσπορίνη στους πολυμορφισμούς rs776746 και rs2740574.

Κωδικός ασθενή	CYP3A5	CYP3A4
1	G/G	A/A
2	A/A	A/A
3	G/G	A/A
4	G/G	A/A
5	G/G	A/A
6	G/G	A/A
7	G/G	A/A
8	G/G	A/A
9	G/G	A/A
16	G/G	A/A
17	G/G	A/A
18	G/G	A/A
20	G/G	A/A
22	G/G	A/A
23	G/G	A/A
24	G/G	A/A
25	G/G	A/A
32	G/G	A/A
33	G/G	A/A
35	G/G	A/A
36	G/G	A/A
38	G/G	A/A
39	G/G	A/A
40	G/G	A/A
42	G/G	A/A
43	G/G	A/A
47	G/G	A/A
50	G/G	A/A
51	A/G	A/A
53	G/G	A/A
55	A/G	A/G
58	G/G	A/A
59	G/G	A/A

Κωδικός ασθενή	CYP3A5	CYP3A4
62	G/G	A/A
63	G/G	A/A
64	G/G	A/A
69	G/G	A/A
72	A/G	A/A
73	G/G	A/A
74	G/G	A/A
76	A/G	A/G
77	G/G	A/A
79	G/G	A/A
81	G/G	A/A
82	G/G	A/A
83	G/G	A/A
84	G/G	A/A
85	G/G	A/A
86	G/G	A/A
89	G/G	A/A
93	G/G	A/A
30	A/G	A/A
40	G/G	A/A
140	G/G	A/A
150	G/G	A/A
160	G/G	A/A
180	G/G	A/A
230	A/G	A/A
250	G/G	A/A
260	G/G	A/A
290	G/G	A/A
400	G/G	A/A

3.5 ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΤΩΝ ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΣΜΩΝ rs776746 & rs2740574 ΜΕ ΤΗΝ ΑΠΟΚΡΙΣΗ ΣΤΗ ΘΕΡΑΠΕΙΑ

Για την ανάλυση των πολυμορφισμών rs776746 και rs2740574 των γονιδίων *CYP3A5* και *CYP3A4* αντίστοιχα, οι ασθενείς χωρίστηκαν σε ανταποκριθέντες και μη ανταποκριθέντες. Οι ασθενείς ομαδοποιήθηκαν σε ομόζυγους και ετερόζυγους για τους πολυμορφισμούς. Για τη δοκιμή ισορροπίας Hardy-Weinberg χρησιμοποιήθηκε το τεστ χ^2 , ενώ η συσχέτιση των αλληλομόρφων με την ανταπόκριση των ασθενών στη θεραπεία έγινε με το τεστ Cochran-Armitage. Ο πολυμορφισμός στο γονίδιο *CYP3A4* δεν ακολουθεί την ισορροπία Hardy-Weinberg. Γι' αυτό το λόγο τα αποτελέσματα από τη μελέτη αυτού του πολυμορφισμού δεν μπορούν να αναλυθούν στατιστικά.

Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε $P < 0.05$.

Η συσχέτιση γονοτύπου των ασθενών και της συχνότητας των αλληλομόρφων με την ανταπόκριση στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη μετά από 3 μήνες θεραπεία φαίνεται στον Πίνακα 8.

Πίνακας 8: Συσχέτιση ανάμεσα στο γονότυπο των ασθενών και την ανταπόκριση στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη (n=63) για τον πολυμορφισμό rs776746 του γονιδίου *CYP3A5*.

<u>Γονίδιο, Πολυμορφισμός</u>	<u>Test</u>	<u>Ανταποκριθέντες (PASI≥75%)</u>	<u>Μη-ανταποκριθέντες (PASI<50%)</u>	<u>P value</u>
CYP3A5 A6986G (rs776746)	Genotypic [GG/GA/AA]	36/4/0	20/2/1	0.75
	Cochran-Armitage [G/A]	76/4 (0.95)	42/4 (0.954)	0.62
	Επικρατών [(GG+GA)/AA]	40/0	22/1	0.36
	Υπολειπόμενο [GG/(GA+AA)]	36/4	20/3	0.69

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η κυκλοσπορίνη (αναστολέας καλσινευρίνης) είναι ένα από τα κυριότερα ανοσοκατασταλτικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται σήμερα και πολλές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί αποσκοπούν στην ανάδειξη των παραμέτρων εκείνων που θα βελτιστοποιήσουν την εξατομίκευση της χορήγησής της. Πραγματοποιείται σημαντική έρευνα για το ποια γονίδια και ποιοι πολυμορφισμοί ευθύνονται για τη διακύμανση της κινητικής των αναστολέων καλσινευρίνης και τα αποτελέσματα των μελετών παραμένουν αντικρουόμενα.

Τα ένζυμα της οικογένειας CYP450 και κυρίως οι ισομορφές CYP3A4 και CYP3A5 επιτελούν περίπου το 75% του συνόλου των μεταβολικών αντιδράσεων. Αυτές οι δύο ισομορφές είναι υπεύθυνες για το μεταβολισμό του 50% των κλινικά χρησιμοποιούμενων φαρμάκων, συμπεριλαμβανομένης και της κυκλοσπορίνης. Πολλοί γενετικοί πολυμορφισμοί σε αυτά τα ένζυμα επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα των φαρμάκων και γι' αυτό θεωρούνται σημαντικοί δείκτες στην ανάπτυξη εξατομικευμένης θεραπείας βασισμένη στο γενετικό προφίλ του κάθε ασθενή.

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε με σκοπό τη διερεύνηση της συσχέτισης των πολυμορφισμών rs2740574 και rs776746 των γονιδίων *CYP3A4* και *CYP3A5* αντίστοιχα, με την ανταπόκριση των ασθενών με ψωρίαση στη θεραπεία με το ανοσοκατασταλτικό φάρμακο, κυκλοσπορίνη.

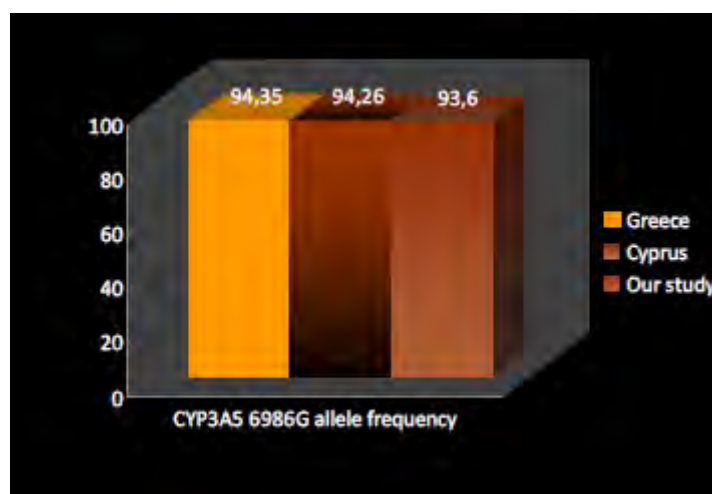
Η επιλογή των συγκεκριμένων πολυμορφισμών έγινε διότι εμφανίζονται με συχνότητα μεγαλύτερη του 5% στον ελληνικό πληθυσμό και επιπλέον, η διεθνής βιβλιογραφία υποστηρίζει ότι επηρεάζει σημαντικά το μεταβολισμό των αναστολέων καλσινευρίνης (Zheng et.al, 2013).

Οι περισσότερες μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί σε ασθενείς μετά από μεταμόσχευση.

Στο γονίδιο *CYP3A4*, ο πολυμορφισμός CYP3A4 * 1B (rs2740574) είναι γνωστό ότι αυξάνει τα επίπεδα έκφρασης του γονιδίου αλλάζοντας τη συγγένεια πρόσδεσης του μεταγραφικού παράγοντα NF-AT. Διάφορες μελέτες σε ασθενείς που έχουν δεχθεί μόσχευμα, έχουν δείξει ότι δεν υπάρχει συσχέτιση ανάμεσα στο αλληλόμορφο CYP3A4*1B και την απαιτούμενη δόση κυκλοσπορίνης (Rivory et.al, 2000, Nicolas et.al, 2001, Bouamar et.al, 2011). Κάποιες άλλες έρευνες έχουν δείξει ότι ο πολυμορφισμός CYP3A4*1B επηρεάζει τη φαρμακοκινητική των αναστολέων καλσινευρίνης, καθώς μεταμοσχευμένοι ασθενείς με αυτό το αλληλόμορφο απαιτούν είτε υψηλότερες είτε χαμηλότερες δόσεις φαρμάκων (Hesselink et al, 2003, Hesselink et al, 2004, Zochowska et al, 2012, Tavira et al, 2011, Abdulkareem et al, 2013).

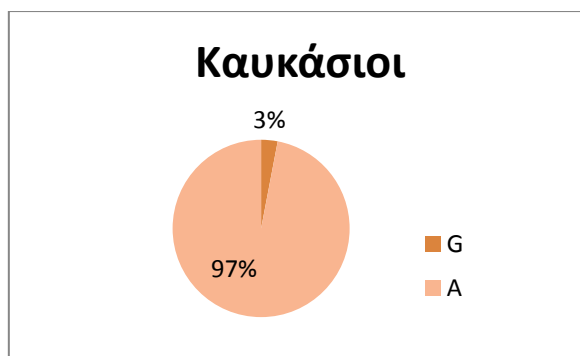
Στο γονίδιο *CYP3A5*, ο πολυμορφισμός *CYP3A5**3 (rs776746) μειώνει την ενεργότητα του ενζύμου λόγω εναλλακτικής συρραφής του πρόδρομου μεταγράφου. Τα αποτελέσματα μελετών που αφορούν τον πολυμορφισμό rs776746 εμφανίζονται επίσης αντικρουόμενα, καθώς άλλες δείχνουν ότι ασθενείς μετά από μεταμόσχευση ήπατος ή νεφρού, με το αγρίου τύπου αλληλόμορφο *CYP3A5**1 (ομόζυγοι ή ετερόζυγοι) απαιτούν διαφορετική δόση φαρμάκου (υψηλότερη ή χαμηλότερη) σε σύγκριση με τους ομόζυγους ασθενείς για το αλληλόμορφο *3 (Press et al, 2009, Yang Dai et al, 2006, Tavora et al, 2011, Jun et al, 2009). Επιπλέον, άλλες μελέτες, έδειξαν ότι δεν υπάρχει συσχέτιση του αλληλομόρφου *3 του γονιδίου *CYP3A5* με τη φαρμακοκινητική της κυκλοσπορίνης (Hesslink et al, 2004, Azarpira et al, 2006, Bouamar et al, 2011).

Στη μελέτη μας, στο γονίδιο *CYP3A5*, 1,59% (n=1) των ασθενών είναι ομόζυγοι για το αλληλόμορφο *1, 88,9% (n=56) είναι ομόζυγοι για το αλληλόμορφο *3 και 9,52% (n=6) ετερόζυγοι (*1/*3). Η συχνότητα του αλληλομόρφου *3 στον πληθυσμό μελέτης είναι σε συμφωνία (~95%) με αυτή που έχει αναφερθεί σε προηγούμενες μελέτες στον ελληνικό πληθυσμό αλλά και σε Καυκάσιους (Arvanitidis et al, 2007, Hadjipanagi et al, 2014, Adler et al, 2009) (Εικόνα 15). Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το δείγμα μας είναι αντιπροσωπευτικό του πληθυσμού.



Εικόνα 15: Συχνότητα του κοινού αλληλομόρφου *CYP3A5* 6986G στη μελέτη μας σε σύγκριση με άλλες δύο μελέτες στον ελληνικό πληθυσμό (Arvanitidis et al, 2007, Hadjipanagi et al, 2014).

Όσον αφορά το γονίδιο *CYP3A4*, το 96,8% (n=61) των ασθενών είναι ομόζυγοι για το αλληλόμορφο *1 (A392), 0% (n=0) είναι ομόζυγοι για το αλληλόμορφο *1B και 3,2% (n=2) ετερόζυγοι (*1/*1B). Η συχνότητα των αλληλομόρφων *CYP3A4**1 και *1B στον πληθυσμό μελέτης είναι 98% και 1,8%, που συμφωνούν με αυτές που αναφέρονται σε μελέτες σε άλλους Καυκάσιους (Drögemöller B et al, 2013) (Εικόνα 16).



Εικόνα 16: Κατανομή των αλληλομορφικών συχνοτήτων σε πληθυσμό Ευρωπαίων.

Τα προκαταρκτικά αποτελέσματα αυτής της μελέτης δεν έδειξαν στατιστικά σημαντική συσχέτιση μεταξύ των πολυμορφισμών rs2740574 και rs776746 και της ανταπόκρισης των ψωριασικών ασθενών στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη. Ως αποτέλεσμα αυτού, αυτοί οι δύο πολυμορφισμοί (SNPs) αποκλείονται από τη χρήση τους ως φαρμακογενετικοί δείκτες ψωρίασης-κυκλοσπορίνης στον ελληνικό πληθυσμό.

Παρόλα αυτά θα ήταν ενδιαφέρον, η σχέση των πολυμορφισμών με την ανταπόκριση στη θεραπεία με κυκλοσπορίνη να επιβεβαιωθεί σε μεγαλύτερο δείγμα ασθενών καθώς και σε μελέτες δόσης-απόκρισης, καθώς στην κλινική πράξη η δόση κυμαίνεται μεταξύ 3-5mg.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

- 1) Langley B, Krueger G., Griffiths M. (2005), ‘‘Psoriasis: epidemiology, clinical features, and quality of life’’, *Ann Rheum Dis*, (Suppl II):18–23
- 2) Καραμπίδου Κ., Μπαλαμώτη Ε., Αντωνίου Χ., (2010), ‘‘Ψωρίαση: Βασικές έννοιες.’’, *Ελλ. Επιθ. Δερμ. Αφρ.* 21:4 221-234
- 3) Steven Wong, Mark Linder, Roland Valdes, (2010), ‘‘_Pharmacogenomics and proteomics: enabling the practice of personalized medicine’’, *Επιστημονικές εκδόσεις Παρισιανου Α.Ε.*
- 4) Henseler T, Christophers E. (1985), ‘‘ Psoriasis of early and late onset: characterization of two types of psoriasis vulgaris.’’, *J Am Acad Dermatol* 13(3):450-6
- 5) Andrew C Palfreeman, Kay E McNamee, and Fiona E McCann. (2013), ‘‘ New developments in the management of psoriasis and psoriatic arthritis: a focus on apremilast’’, *Drug Des Devel Ther* 7:201-210
- 6) Jung-Tai Liu, Horng-Ming Yeh, Shyun-Yeu Liu, and Kow-Tong Chen. (2014), ‘‘ Psoriatic arthritis: Epidemiology, diagnosis, and treatment’’, *World J Orthop* 5(4):537-543
- 7) U. Mrowietz, K. Kragballe, K. Reich, P. Spuls, C. E. M. Griffiths, A. Nast, J. Franke, C. Antoniou, P. Arenberger, F. Balieva, M. Bylaite, O. Correia, E. Daudén, P. Gisondi, L. Iversen, L. Kemény, M. Lahfa, T. Nijsten, T. Rantanen, A. Reich, T. Rosenbach, S. Segaert, C. Smith, T. Talme, B. Volc-Platzer, and N. Yawalkar, (2011), ‘‘ Definition of treatment goals for moderate to severe psoriasis: a European consensus’’, *Arch Dermatol Res* 303(1): 1-10
- 8) Krueger GG, Feldman SR, Camisa C, Duvic M, Elder JT, Gottlieb AB, Koo J, Krueger JG, Lebwohl M, Lowe N, Menter A, Morison WL, Prystowsky JH, Shupack JL, Taylor JR, Weinstein GD, Barton TL, Rolstad T, Day RM.. (2000), ‘‘ Two considerations for patients with psoriasis and their clinicians: what defines mild, moderate, and severe psoriasis? What constitutes a clinically significant improvement when treating psoriasis?’’, *J Am Acad Dermatol* 43:281-5
- 9) Κοσμάδακη Μ., Αντωνίου Χ., Αυγερινού Γ., Στρατηγός Α.Ι, Σταυρόπουλος Π., Ποτουρίδου Ε, Πολυδώρου Δ., Στεφανάκη Ε, Κατσάμπας Α. (2007), ‘‘Ψωρίαση 2008: Θεραπευτικός οδηγός’’, *Ελλ. Επιθ. Δερμ. Αφρ.* 18:2 161-173
- 10) Sanjeev J Aurangabadkar. (2013), ‘‘Comorbidities in psoriasis’’, *Department of Dermatology, Skin and Laser Clinic, Hyderabad, India.* 79:7 10-17

- 11) Onumah N, Kircik LH. (2012), '' Psoriasis and its comorbidities.'', J Drugs Dermatol. 11 5-10.
- 12) Fernandez-Torres RM1, Paradela S, Fonseca E. (2012), '' Psoriasis in patients older than 65 years. A comparative study with younger adult psoriatic patients.'', J Nutr Health Aging. 16(6):586-91.
- 13) P Rahman, J T Elder. (2005), ''Genetic epidemiology of psoriasis and psoriatic arthritis.'', Ann Rheum Dis, 64 (Suppl II):37-39
- 14) Juliana L Basko-Plluska, Vesna Petronic-Rosic. (2012), '' Psoriasis: epidemiology, natural history, and differential diagnosis'', Dovepress. 2 67-76
- 15) Lowes MA , Bowcock AM, Krueger JG. (2007), '' Pathogenesis and therapy of psoriasis.'', Nature 22;445(7130):866-73.
- 16) Trembath RC, Clough RL, Rosbotham JL, Jones AB, Camp RD, Frodsham A, Browne J, Barber R, Terwilliger J, Lathrop GM, Barker JN. (1997), '' Identification of a major susceptibility locus on chromosome 6p and evidence for further disease loci revealed by a two stage genome-wide search in psoriasis''. Hum Mol Genet 6(5):813-20.
- 17) Vinod Chandran (2010), ''GENETICS OF PSORIASIS AND PSORIATIC ARTHRITIS''. Indian J Dermatol. 55(2): 151–156.
- 18) Holzmann, H., R. J. Werner, et al. (1992), ''Detection of the Kobner phenomenon of the skeleton of patients with psoriasis." Hautarzt 43(10): 645-51.
- 19) England RJ, Strachan DR, Knight LC (1997), '' Streptococcal tonsillitis and its association with psoriasis: a review.'', Clin Otolaryngol Allied Sci 22:532–535.
- 20) Fry L, Baker BS (2007), ''Triggering psoriasis: the role of infections and medications''. Clin Dermatol 25:606–615
- 21) Morar N, Willis-Owen SA, Maurer T, Bunker CB. (2010), ''HIV-associated psoriasis: pathogenesis, clinical features, and management''. Lancet Infect Dis 10: 470-8
- 22) Mallbris, L., P. Larsson, et al. (2005), ''Psoriasis phenotype at disease onset: clinical characterization of 400 adult cases''. J Invest Dermatol 124(3): 499-504.

- 23) O'Brien, M. and J. Koo (2006), '' The mechanism of lithium and beta-blocking agents in inducing and exacerbating psoriasis'' J Drugs Dermatol 5(5): 426-32
- 24) Kirsty J Rutter, Rachel E B Watson, Lindsey F Cotterell, Thomas Brenn, Christopher E M Griffiths and Lesley E Rhodes (2009), '' Severely Photosensitive Psoriasis: A Phenotypically Defined Patient Subset''. Journal of Investigative Dermatology 129, 2861–2867
- 25) Higgins E (2000), ''Alcohol, smoking and psoriasis'', Clin Exp Dermatol. 25(2):107-10.
- 26) Anne M. Bowcock and James G. Krueger (2005), ''Getting under the skin: the immunogenetics of psoriasis'', Nature Reviews Immunology 5, 699-711
- 27) Rajiv Joshi (2004), ''Immunopathogenesis of psoriasis'' Indian J Dermatol 70:1
- 28) M Lebwohl, P T Ting, J Y M Koo (2005), '' Psoriatic arthritis and psoriasis: treatment, Psoriasis treatment: traditional therapy'', Ann Rheum Dis 64:ii83-ii86
- 29) O'Neill J. and Feldman S. (2010). ''Vitamine D analogue-based therapies for psoriasis.'' Drugs of Today 46(5):351-360
- 30) Weischer M., Blum A., Eberhard F., Rocken M. and Berneburg M. (2004). No Evidence for Increased Skin Cancer Risk in Psoriasis Patients Treated with Broadband or Narrowband UVB Phototherapy: A First Retrospective Study. Acta Derm Venereol 84: 370–374
- 31) Sullivan J. and Preda V. (2009), '' Treatments for severe psoriasis'', Aust Prescr. 32:14–18
- 32) Sivamani R.,Correa G., Ono Y., Bowen.,Raychaudhuri S. and Maverakis E. (2010). ''BIOLOGICAL THERAPY OF PSORIASIS'', Indian J Dermatol. 55(2): 161–170
- 33) Jennifer K Tan, Abhishek Aphale, Rama Malaviya, Yvonne Sun and Alice B Gottlieb (2007), ''Mechanisms of Action of Etanercept in Psoriasis'', Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings (2007) 12, 38–45.
- 34) Dubois-Declerc S. and Pouliot R. (2013) ''Promising New Treatments for Psoriasis.'' The Scientific World Journal Volume 2013, Article ID 980419
- 35) Weinblatt M., Keystone E., Furst D., Moreland L., Weisman M., Birbara C., Teoh L., Fischkoff S. and Chartash E. (2003). Adalimumab, a fully human anti–tumor necrosis factor α monoclonal antibody, for the treatment of rheumatoid arthritis in

patients taking concomitant methotrexate. *Arthritis & Rheumatism*. Volume 48, Issue 1, pages 35–45

- 36) Amevive (Alefcept) [package insert] [last accessed 2014 May 15]. Available from: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/HowDrugsareDevelopedandApproved/ApprovalApplications/TherapeuticBiologicApplications/ucm086009.pdf>
- 37) Virendra N Sehgal, Deepika Pandhi, and Ananta Khurana (2014), ‘‘Biologics in Dermatology: An Integrated Review’’, *Indian J Dermatol* 59(5): 425–441.
- 38) Gerald D. Weinstein, MD; Phillip Frost, M (1971), ‘‘Methotrexate for Psoriasis. A New Therapeutic Schedule’’, *Arch Dermatol* 103(1):33-38
- 39) Petcher TJ, Weber H, Rüegger A. (1976), ‘‘Crystal and molecular structure of an iodo-derivative of the cyclic undecapeptide cyclosporin A.’’ *Helv Chim Acta* 14;59(5):1480-9.
- 40) Mueller W, Herrmann B (1979), ‘‘Cyclosporin A for psoriasis.’’, *N Engl J Med* 301: 555
- 41) Edward M. Prodanovic and Neil J. Korman (2008), ‘‘Traditional systemic therapy I: methotrexate and cyclosporine’’, *Treatment of Psoriasis Department of Dermatology, Murdough Family Center for Psoriasis, University Hospitals Case*
- 42) Fantini MC, Becker C, Kiesslich R, Neurath MF. (2006), ‘‘Drug insight: novel small molecules and drugs for immunosuppression.’’, *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 3(11):633-44.
- 43) Nabel GJ (1999). ‘‘A transformed view of cyclosporine.’’ *Nature* 397:471–472.
- 44) Ho VC.(2004), ‘‘The use of ciclosporin in psoriasis: a clinical review.’’, *Br J Dermatol*. 150 Suppl 67:1-10.
- 45) Asifa S. Haider, Michelle A. Lowes, Mayte Suárez-Fariñas, Lisa C. Zaba, Irma Cardinale, Artemis Khatcherian, Inna Novitskaya, Knut M. Wittkowski and James G. Krueger (2008), ‘‘Identification of Cellular Pathways of ‘‘Type 1,’’ Th17 T Cells, and TNF- and Inducible Nitric Oxide Synthase-Producing Dendritic Cells in Autoimmune Inflammation through Pharmacogenomic Study of Cyclosporine A in Psoriasis’’, *The Journal of Immunology* vol. 180 no. 3 1913-1920
- 46) Griffiths CE, Dubertret L, Ellis CN, Finlay AY, Finzi AF, Ho VC, Johnston A, Katsambas A, Lison AE, Naeyaert JM, Nakagawa H, Paul C, Vanaclocha F. (2004), ‘‘Ciclosporin in psoriasis clinical practice: an international consensus statement.’’ *Br J Dermatol*. 150 Suppl 67:11-23

- 47) CEM Griffiths, CM Clark, RJG Chalmers, A Li Wan Po, HC Williams, (2000), "A systematic review of treatments for severe psoriasis", *Health Technology Assessment* 4:4
- 48) Se'verine Crettol, Jean-Pierre Venetz, Massimiliano Fontana, John-David Aubert, Manuel Pascual, and Chin B. Eap, (2008), "CYP3A7, CYP3A5, CYP3A4, and ABCB1 Genetic Polymorphisms, Cyclosporine Concentration, and Dose Requirement in Transplant Recipients", *Ther Drug Monit* 30:689–699
- 49) DJAR Moes, JJ Swen, J den Hartigh, T van der Straaten, JJ Homan van der Heide, JS Sanders, FJ Bemelman, JW de Fijter and HJ Guchelaar, (2014) "Effect of CYP3A4*22, CYP3A5*3, and CYP3A Combined Genotypes on Cyclosporine, Everolimus, and Tacrolimus Pharmacokinetics in Renal Transplantation", *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*. 12;3:e100.
- 50) Klupp J, Holt DW, van Gelder T., (2002), "How pharmacokinetic and pharmacodynamic drug monitoring can improve outcome in solid organ transplant recipients." *Transpl Immunol*. 9(2-4):211-4.
- 51) Duricová J, Grundmann M, (2007), "Cytochrome P450 3A polymorphism and its importance in cyclosporine and tacrolimus therapy in transplanted patients", *Ceska Slov Farm*. 56(5):220-4.
- 52) Shoji Kawauchi, Tsutomu Nakamura, Ikuya Miki, Jun Inoue, Tsuneo Hamaguchi, Toshihito Tanahashi, and Shigeto Mizuno, (2014), "Downregulation of CYP3A and P-Glycoprotein in the Secondary Inflammatory Response of Mice With Dextran Sulfate Sodium–Induced Colitis and Its Contribution to Cyclosporine A Blood Concentrations" *J Pharmacol Sci* 124, 180–191
- 53) Schwab M, Eichelbaum M, Fromm MF, (2003), "Genetic polymorphisms of the human MDR1 drug transporter", *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43:285-307.
- 54) Sakaeda T, Nakamura T, Okumura K (2003), "Pharmacogenetics of MDR1 and its impact on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs.", *Pharmacogenomics*. 4(4):397-410.
- 55) Guengerich FP, (1999), "Cytochrome P-450 3A4: regulation and role in drug metabolism", *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 39:1-17.
- 56) Ekins S, Stresser DM, Williams JA., (2003), "In vitro and pharmacophore insights into CYP3A enzymes.", *Trends Pharmacol Sci*. 24(4):161-6.
- 57) Wojnowski L (2004), "Genetics of the variable expression of CYP3A in humans.", *Ther Drug Monit*. 26(2):192-9.

- 58) Kuehl P , Zhang J, Lin Y, Lamba J, Assem M, Schuetz J, Watkins PB, Daly A, Wrighton SA, Hall SD, Maurel P, Relling M, Brimer C, Yasuda K, Venkataramanan R, Strom S, Thummel K, Boguski MS, Schuetz E., (2001), '' Sequence diversity in CYP3A promoters and characterization of the genetic basis of polymorphic CYP3A5 expression.'' Nat Genet. 27(4):383-91.

- 59) Xiaoping Chen, Haijian Wang, Gangqiao Zhou, Xiumei Zhang, Xiaojia Dong, Lianteng Zhi, Li Jin, and Fuchu He, (2009), ''Molecular Population Genetics of Human CYP3A Locus: Signatures of Positive Selection and Implications for Evolutionary Environmental Medicine'', Environ Health Perspect 117:10

- 60) Timothy R. Rebbeck, Julie M. Jaffe, Amy H. Walker, Alan J. Wein and S. Bruce Malkowicz, (1998), ''Modification of Clinical Presentation of Prostate Tumors by a Novel Genetic Variant in CYP3A4'' J Natl Cancer Inst 90:16 1225-1229

- 61) Channa Keshava, Erin C. McCanlies and Ainsley Weston, (2004), ''CYP3A4 Polymorphisms—Potential Risk Factors for Breast and Prostate Cancer: A HuGE Review'', American Journal of Epidemiology 160: 9, 825-841

- 62) Jatinder K. Lamba, Yvonne S. Lin, Kenneth Thummel, Ann Daly, Paul B. Watkins, Stephen Strom, Jiong Zhang and Erin G. Schuetz, (2002), '' Common allelic variants of cytochrome P4503A4 and their prevalence in different populations'' Pharmacogenetics 12:121-132

- 63) Amirimani B, Ning B, Deitz AC, Weber BL, Kadlubar FF, Rebbeck TR.(2003), '' Increased transcriptional activity of the CYP3A4*1B promoter variant'' Environ Mol Mutagen. 42(4):299-305.

- 64) L. P. Rivory, H. Qin, S. J. Clarke, J. Eris, G. Duggin, E. Ray, R. J. Trent, J. F. Bishop (2000), '' Frequency of cytochrome P 450 3A4 variant genotype in transplant population and lack of association with cyclosporin clearance'' European Journal of Clinical Pharmacology 56:5 395-398

- 65) Adler G, Łoniewska B, Parczewski M, Kordek A, Ciechanowicz A., (2009), '' Frequency of common CYP3A5 gene variants in healthy Polish newborn infants.'' Pharmacol Rep. 61(5):947-51.

- 66) Nicolas von Ahsen, Michael Richter, Clemens Grupp, Burckhardt Ringe, Michael Oellerich and Victor W. Armstrong (2001), '' No Influence of the MDR-1 C3435T Polymorphism or a CYP3A4 Promoter Polymorphism (CYP3A4-V Allele) on Dose-adjusted Cyclosporin A Trough Concentrations or Rejection Incidence in Stable Renal Transplant Recipients'', Clinical Chemistry 47:6

- 67) Bouamar R, Hesselink DA, van Schaik RH, Weimar W, Macphee IA, de Fijter JW, van Gelder T, (2011), '' Polymorphisms in CYP3A5, CYP3A4, and ABCB1 are not associated with cyclosporine pharmacokinetics nor with cyclosporine clinical end points after renal transplantation.'', *Ther Drug Monit.* 33(2):178-84.
- 68) Hesselink DA, van Schaik RH, van der Heiden IP, van der Werf M, Gregoor PJ, Lindemans J, Weimar W, van Gelder T. (2003), '' Genetic polymorphisms of the CYP3A4, CYP3A5, and MDR-1 genes and pharmacokinetics of the calcineurin inhibitors cyclosporine and tacrolimus.'', *Clin Pharmacol Ther.* 74(3):245-54.
- 69) Hesselink DA, van Gelder T, van Schaik RH, Balk AH, van der Heiden IP, van Dam T, van der Werf M, Weimar W, Mathot RA., (2004), '' Population pharmacokinetics of cyclosporine in kidney and heart transplant recipients and the influence of ethnicity and genetic polymorphisms in the MDR-1, CYP3A4, and CYP3A5 genes.'', *Clin Pharmacol Ther.* 76(6):545-56.
- 70) Żochowska D, Wyzgał J, Pączek L.(2012), '' Impact of CYP3A4*1B and CYP3A5*3 polymorphisms on the pharmacokinetics of cyclosporine and sirolimus in renal transplant recipients'', *Ann Transplant.* 17(3):36-44.
- 71) Tavira B, Coto E, Díaz-Corte C, Ortega F, Arias M, Torres A, Díaz JM, Selgas R, López-Larrea C, Campistol JM, Alvarez V; REDINREN Pharmacogenetics group.(2011), '' Pharmacogenetics of tacrolimus after renal transplantation: analysis of polymorphisms in genes encoding 16 drug metabolizing enzymes.'', *Clin Chem Lab Med.* 49(5):825-33.
- 72) Abdulkareem Albekairy, Abdulmalik Alkatheri, Shiro Fujita, Alan Hemming, Richard Howard, Alan Reed, and Janet Karlix(2013), '' Cytochrome P450 3A4*1B as Pharmacogenomic Predictor of Tacrolimus Pharmacokinetics and Clinical Outcome in the Liver Transplant Recipients'', *Saudi J Gastroenterol.* 19(2): 89–95.
- 73) Vannaprasaht S, Reungjui S, Supanya D, Sirivongs D, Pongskul C, Avihingsanon Y, Tassaneeyakul W. (2013), '' Personalized tacrolimus doses determined by CYP3A5 genotype for induction and maintenance phases of kidney transplantation'', *Clin Ther.* 35(11):1762-9.

- 74) Anders Åsberg, Karsten Midtvedt, Mike van Guilder, Elisabet Størset, Sara Bremer, Stein Bergan, Roger Jelliffe, Anders Hartmann, and Michael N Neely (2013), "Inclusion of CYP3A5 genotyping in a nonparametric population model improves dosing of tacrolimus early after transplantation", *Transpl Int* 26(12): 1198–1207
- 75) De Jonge H, de Loor H, Verbeke K, Vanrenterghem Y, Kuypers DR.(2013), "Impact of CYP3A5 genotype on tacrolimus versus midazolam clearance in renal transplant recipients: new insights in CYP3A5-mediated drug metabolism.", *Pharmacogenomics*. 14(12):1467-80.
- 76) Songmao Zheng, Yasar Tasnif, Mary F. Hebert, Connie L. Davis, Yoshihisa Shitara, Justina C. Calamia, Yvonne S. Lin, Danny D. Shen, and Kenneth E. Thummel (2013), "CYP3A5 Gene Variation Influences Cyclosporine A Metabolite Formation and Renal Cyclosporine Disposition", *Transplantation*. 95(6): 821–827.
- 77) Press RR, Ploeger BA, den Hartigh J, van der Straaten T, van Pelt J, Danhof M, de Fijter JW, Guchelaar HJ (2009), "Explaining variability in tacrolimus pharmacokinetics to optimize early exposure in adult kidney transplant recipients", *Ther Drug Monit*. 31(2):187-97.
- 78) Yang Dai, Mary F. Hebert, Nina Isoherranen, Connie L. Davis, Christopher Marsh, Danny D. Shen and Kenneth E. Thummel (2006), "EFFECT OF CYP3A5 POLYMORPHISM ON TACROLIMUS METABOLIC CLEARANCE IN VITRO", *DMD* 34:5 836-847
- 79) Jun KR, Lee W, Jang MS, Chun S, Song GW, Park KT, Lee SG, Han DJ, Kang C, Cho DY, Kim JQ, Min WK. (2009), "Tacrolimus concentrations in relation to CYP3A and ABCB1 polymorphisms among solid organ transplant recipients in Korea", *Transplantation*. 27;87(8):1225-31
- 80) Azarpira N, Aghdaie MH, Behzad-Behbahanie A, Geramizadeh B, Behzadi S, Malekhoseinie SA, Raisjalal GH, Rahsaz M, Pourgholami A, Sagheb F (2006), "Association between cyclosporine concentration and genetic polymorphisms of CYP3A5 and MDR1 during the early stage after renal transplantation." *Exp Clin Transplant*. 4(1):416-9.
- 81) <http://www.psoriasis.org/>- National Psoriasis Foundation

- 82) Rahsaz M, Azarpira N, Nikeghbalian S, Aghdaie MH, Geramizadeh B, Moini M, Banihashemi M, Darai M, Malekpour Z, Malekhosseini SA,(2012) '' Association between tacrolimus concentration and genetic polymorphisms of CYP3A5 and ABCB1 during the early stage after liver transplant in an Iranian population.'', Exp Clin Transplant. 10(1):24-9.
- 83) Britt Drögemöller, Marieth Plummer, Lundi Korkie, Gloudi Agenbag, Anke Dunaiski, Dana Niehaus, Liezl Koen, Stefan Gebhardt, Nicol Schneider, Antonel Olckers, Galen Wright, and Louise Warnich (2013), '' Characterization of the genetic variation present in CYP3A4 in three South African populations'', Front Genet. 4: 17.
- 84) Arvanitidis K, Ragia G, Iordanidou M, Kyriaki S, Xanthi A, Tavridou A, Manolopoulos VG., (2007)'' Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19 and CYP3A5 in the Greek population.'', Fundam Clin Pharmacol. 21(4):419-26.
- 85) Despina Hadjipanagi, Stephanie Chrysanthou, Konstantinos Voskarides and Constantinos Deltas (2014), ''Genetic polymorphisms in warfarin and tacrolimus-related genes *VKORC1*, *CYP2C9* and *CYP3A5* in the Greek-Cypriot population'' BMC Research Notes 7:123
- 86) Adler G, Łoniewska B, Parczewski M, Kordek A, Ciechanowicz A (2009), ''Frequency of common CYP3A5 gene variants in healthy Polish newborn infants.'', Pharmacol Rep. 61(5):947-51.
- 87) Ramirez J., Fernandez-Sueiro J., Lopez R., Montilla C., Suarez B., Moll C., Rodriguez R., Blanco F., Alsina M., Sanmarti R., Lozano F. and J Canete J. (2010). Influence of variants of Fcγ receptor IIA on the European league against rheumatism responses to anti-tumour necrosis factor alpha therapy in psoriatic arthritis. Journal of Translational Medicine 8 (Suppl 1):P38
- 88) Ramirez J., Fernandez-Sueiro J., Lopez R., Montilla C., Arias M., Moll C., Alsina M., Sanmarti R., Lozano F. and Canete J. (2012). FCGR2A/CD32A and FCGR3A/CD16A Variants and EULAR Response to Tumor Necrosis Factor-α Blockers in Psoriatic Arthritis: A Longitudinal Study with 6 Months of Followup. J Rheumatol 39:1035-1041

- 89) Vasilopoulos Y., Sarafidou Th., Ntoumou E., Zafiriou E., Bagiatis V., Stamatis C., Patsatsi A., Sotiriadis D., Roussaki-Schulze A., Mamuris Z. (2013) Pharmacogenetic association study of ABCB1 and MTHFR gene polymorphisms and Cyclosporine/Methotrexate treatment response in patients with psoriasis in the Greek population. *Pharmacogenomics and Personalised Medicine* (in press)
- 90) Vasilopoulos Y., Manolika M., Zafiriou E., Sarafidou T., Bagiatis V., Kruger-Krasagaki S., Tosca A., Patsatsi A., Sotiriadis D., Mamuris Z. and Roussaki-Schulze A. (2012). Pharmacogenetic Analysis of TNF, TNFRSF1A, and TNFRSF1B Gene Polymorphisms and Prediction of Response to Anti-TNF Therapy in Psoriasis Patients in the Greek Population. *Mol Diagn Ther* 15 (6): 1-6
- 91) Julià M, Guilabert A, Lozano F, Suarez-Casasús B, Moreno N, Carrascosa JM, Ferrándiz C, Pedrosa E, Alsina-Gibert M, Mascaró JM Jr. (2013), "The role of Fcγ receptor polymorphisms in the response to anti-tumor necrosis factor therapy in psoriasis A pharmacogenetic study." *JAMA Dermatol.* 149(9):1033-9.
- 92) Yiannis Vasilopoulos, Despoina Papadopoulou, Lida Aggelou, Efterpi Zafiriou, Angeliki Roussaki-Schulze, Aikaterini Patsatsi, Dimitris Sotiriadis, Constantina Sarri, Costas Stamatis, Zissis Mamuris, Theologia Sarafidou (2014), "FcγR polymorphisms in the treatment of psoriasis with Fc-containing TNF inhibitors in the Greek population" (αναρτημένη ανακοίνωση, 65^ο Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, 2014).